CPL binaire
Agilent 1260 Infinity

Mode d'emploi du système

Agilent Technologies

Avertissements

© Agilent Technologies, Inc. 2006, 2008-2011, 2013

Conformément aux lois nationales et internationales relatives à la propriété intellectuelle, toute reproduction totale ou partielle de ce manuel sous quelque forme que ce soit, par quelque moyen que ce soit, voie électronique ou traduction, est interdite sans le consentement écrit préalable de la société Agilent Technologies, Inc.

Référence du manuel

G1312-93303

Edition

02/2013

Imprimé en Allemagne

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Ce produit peut être utilisé en tant que composant d'un dispositif de diagnostic in vitro, si ce dernier est enregistré auprès des autorités compétentes et est conforme aux directives correspondantes. Faute de quoi, il est exclusivement réservé à un usage général en laboratoire.

Version du logiciel

Ce guide s'applique à la version A.01.04 d'OpenLAB Agilent CDS.

Windows ® est une marque déposée aux États-Unis de Microsoft Corporation.

Garantie

Les informations contenues dans ce document sont fournies "en l'état" et pourront faire l'objet de modifications sans préavis dans les éditions ultérieures. Dans les limites de la législation en vigueur, Agilent exclut en outre toute garantie, expresse ou implicite, quant à ce manuel et aux informations contenues dans ce dernier, notamment, mais sans s'y restreindre, toute garantie marchande et aptitude à un but particulier. En aucun cas, Agilent ne peut être tenu responsable des éventuelles erreurs contenues dans ce document, ni des dommages directs ou indirects pouvant découler des informations contenues dans ce document, de la fourniture, de l'usage ou de la qualité de ce document. Si Agilent et l'utilisateur ont souscrit un contrat écrit distinct dont les conditions de garantie relatives au produit couvert par ce document entrent en conflit avec les présentes conditions, les conditions de garantie du contrat distinct se substituent aux conditions stipulées dans le présent document.

Licences technologiques

Le matériel et le logiciel décrits dans ce document sont protégés par un accord de licence et leur utilisation ou reproduction sont soumises aux termes et conditions de ladite licence.

Mentions de sécurité

ATTENTION

Une mention **ATTENTION** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, le produit risque d'être endommagé ou les données d'être perdues. En présence d'une mention **ATTENTION**, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

AVERTISSEMENT

Une mention AVERTISSEMENT signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, les personnes risquent de s'exposer à des lésions graves. En présence d'une mention AVERTISSEMENT, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

Contenu de ce manuel

Ce manuel décrit le CPL binaire Agilent 1260 Infinity.

1 Le Binary LC Agilent 1260 Infinity - Description du produit

Ce chapitre présente les caractéristiques du Binary LC 1260 Infinity.

2 Introduction

Ce chapitre présente le Binary LC Agilent 1260 Infinity et ses principes de fonctionnement.

3 Optimisation du Binary LC Agilent 1260 Infinity

Ce chapitre traite de l'application des notions théoriques et de l'utilisation des caractéristiques du système CPL pour développer des séparations optimisées.

4 Configuration et installation du système

Ce chapitre décrit l'installation du logiciel, l'installation des modules et la préparation du système avant fonctionnement.

5 Guide de démarrage rapide

Ce chapitre traite de l'acquisition de données et du traitement des données avec le Binary LC 1260 Infinity.

6 Annexe

Ce chapitre apporte des informations complémentaires concernant la sécurité, les aspects juridiques, l'Internet et la configuration d'une méthode.

Sommaire

1 Le Binary LC Agilent 1260 Infinity - Description du produit 7

Caractéristiques du Binary LC Agilent 1260 Infinity 8
Composants du système 10
Caractéristiques 22

2 Introduction 27

Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide 28
Avantages des colonnes à petites particules 34
Échauffement par frottement 37

3 Optimisation du Binary LC Agilent 1260 Infinity 39

Configuration d'un volume de retard optimal 40
Comment augmenter le volume d'injection 47
Comment obtenir des durées de cycle plus courtes 49
Comment obtenir le transfert le plus bas 53
Comment améliorer la résolution 55
Comment améliorer la sensibilité 62
Comment empêcher les obstructions de colonne 67

4 Configuration et installation du système 69

Installation du logiciel 70
Installation des modules 72

5 Guide de démarrage rapide 83

À propos du guide de démarrage rapide 84
Préparation du système 85
Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse 90
Traitement des données 98

6 Annexe 103

Informations relatives à la sécurité 104
Informations sur les solvants 107
Agilent Technologies sur Internet 112
Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Modifier l'ensemble de la méthode 113

1
Le Binary LC Agilent 1260 Infinity - Description du produit

Caractéristiques du Binary LC Agilent 1260 Infinity 8
Composants du système 10
Pompe binaire 1260 Infinity (G1312B) 11
Dégazeur haute performance 1260 Infinity (G4225A) 14
Échantillonneur automatique haute performance 1260 Infinity (G1367E) 15
Compartiment à colonnes thermostaté 1290 Infinity (G1316C) 17
Détecteur à barrette de diodes 1260 Infinity (G4212B) 19
Vannes à remplacement rapide 1200 Infinity 21
Caractéristiques 22

Ce chapitre présente les caractéristiques du Binary LC 1260 Infinity.

Caractéristiques du Binary LC Agilent 1260 Infinity

La conception du Binary LC 1260 Infinity est de fournir un chromatographe en phase liquide offrant une capacité de séparation haute résolution, tout en conservant toutes les fonctionnalités des applications HPLC standard. Il offre donc une rétrocompatibilité complète pour vos méthodes HPLC et UHPLC établies. L'utilisation de particules sub-2-microniques (STM) signifie que pour les débits importants ou les longues colonnes, une pression supplémentaire est nécessaire pour entraîner la phase mobile à travers la colonne. Le débit du Binary LC 1260 Infinity est optimisé pour produire une contrepression minimale et les colonnes ZORBAX RRHT ont une distribution de tailles de particule élaborée qui produit beaucoup moins de contrepression que les autres colonnes STM.

Les caractéristiques et avantages du Binary LC Agilent 1260 Infinity sont :

- Le volume de retard configurable jusqu'à 120 µL dans la pompe binaire 1260 Infinity associé à une plage de débit de 0,05 à 5 mL/min à des pressions atteignant 600 bar fournit une application universelle des colonnes à faible diamètre (d.i. 2,1 mm) jusqu'à un diamètre standard (d.i. 4,6 mm), répondant aux besoins des CPL et CPL/MS.
- La configuration du volume de retard standard de la pompe binaire 1260 Infinity vous permet non seulement d'exécuter les méthodes UHPLC, mais aussi les méthodes HPLC conventionnelles sans modifier les modèles chromatographiques.
- La conception de circulation de nouvelle génération de l'échantillonneur automatique haute performance 1260 Infinity atteint la meilleure précision pour une large plage de volumes d'injection (de 0,1 à 100 µL) sans modifier les boucles d'échantillon. Elle est conçue pour un débit d'échantillon élevé, un faible transfert et des cycles d'injection rapides.
- Une température élevée, jusqu'à 100 °C sur certaines colonnes, permet plus de sélectivité, de flexibilité et réduit la viscosité du solvant afin de permettre une séparation encore plus rapide.
- Dans le compartiment à colonne thermostaté 1290 Infinity , différents éléments de chauffage (1,6 µL) et de refroidissement (1,5 µL) pour un faible volume extra-colonne peuvent être installés. La température est réglable de 10 °C sous la température ambiante à 100 °C.

- La nouvelle conception de commande de la vanne d'extraction et les vannes à remplacement rapide par l'utilisateur du compartiment à colonnes thermostaté 1290 Infinity améliorent la convivialité et ouvrent la voie à des solutions de développement à méthodes multiples et méthode automatisée avec débit ultra haut.
- Un kit de tubes à faible dispersion et des cuves à circulation de faible volume minimisent la dispersion du pic pour les colonnes à faible diamètre.
- Solidité de la ligne de base et acquisition spectrale rapide à des fréquences d'acquisition jusqu'à 80 Hz grâce à la nouvelle conception optique du détecteur à barrette de diodes 1260 Infinity .
- Différentes cuves avec débit détecteur UV à utiliser avec des colonnes d'un diamètre interne de 2,1 , 3,0 et 4,6 mm sont disponibles, y compris la nouvelle cuve à circulation de type cartouche Max-Light Agilent révolutionnaire avec une longueur optique de 60 mm (bruit type : <±0,6 µAU/cm) pour une détection ultrasensible.

Une mise à niveau progressive de la série 1100 ou 1200 vers le CPL binaire Agilent 1260 Infinity est possible ; par exemple un détecteur série 1100 ou un compartiment à colonne série 1200 peut encore être utilisé en combinaison avec une pompe binaire 1260 Infinity.

Composants du système

De nombreuses configurations du système Binary LC 1260 Infinity sont possibles, adaptées aux besoins de votre application personnelle. Quelques configurations sont décrites plus en détails dans ce manuel (voir « Configuration et installation du système », page 69). Les modules décrits dans les sections suivantes sont les composants typiques d'un Binary LC 1260 Infinity. En plus de ces composants de base, des solutions individuelles sont disponibles pour des applications spécifiques (dont certaines sont décrites dans le chapitre « Optimisation »).

Pompe binaire 1260 Infinity (G1312B)

La pompe binaire comprend deux pompes identiques intégrées dans le même boîtier. Les gradients binaires sont créés grâce à un mélange sous haute pression. L'amortisseur d'impulsions et le mélangeur peuvent être déconnectés pour des applications à faible débit ou chaque fois qu'un volume transitoire minimal est souhaité. Les applications habituelles sont des méthodes à haut débit d'analyses, avec des gradients rapides sur des colonnes haute résolution de 2,1 mm. La pompe peut fournir un débit de 0,1 – 5 mL/min pour une pression allant jusqu'à 600 bar. Une vanne de sélection de solvant (en option) permet de réaliser des mélanges binaires (isocratiques ou gradients) d'un des deux solvants par voie. L'accessoire de rinçage actif des joints (en option) est disponible pour une utilisation avec des solutions tampons concentrées.

Principe de fonctionnement

La pompe binaire est une pompe à deux voies, à deux pistons en série, comportant toutes les fonctions essentielles d’un système de distribution de solvant. Le dosage du solvant et son transfert du côté haute pression sont assurés par deux pompes qui peuvent générer une pression pouvant atteindre 600 bar.

Chaque voie comporte une pompe comprenant une commande de pompe, une tête de pompe, un clapet actif d'entrée avec cartouche de remplacement et un clapet de sortie. Les deux voies sont introduites dans une chambre de mélange de petit volume qui est reliée par un serpentin réducteur capillaire à un amortisseur et à un mélangeur. Un capteur de pression surveille la pression de la pompe. Une vanne de purge avec fritté en PTFE intégré, placée à la sortie de la pompe, permet un amorçage aisé du système de pompage.

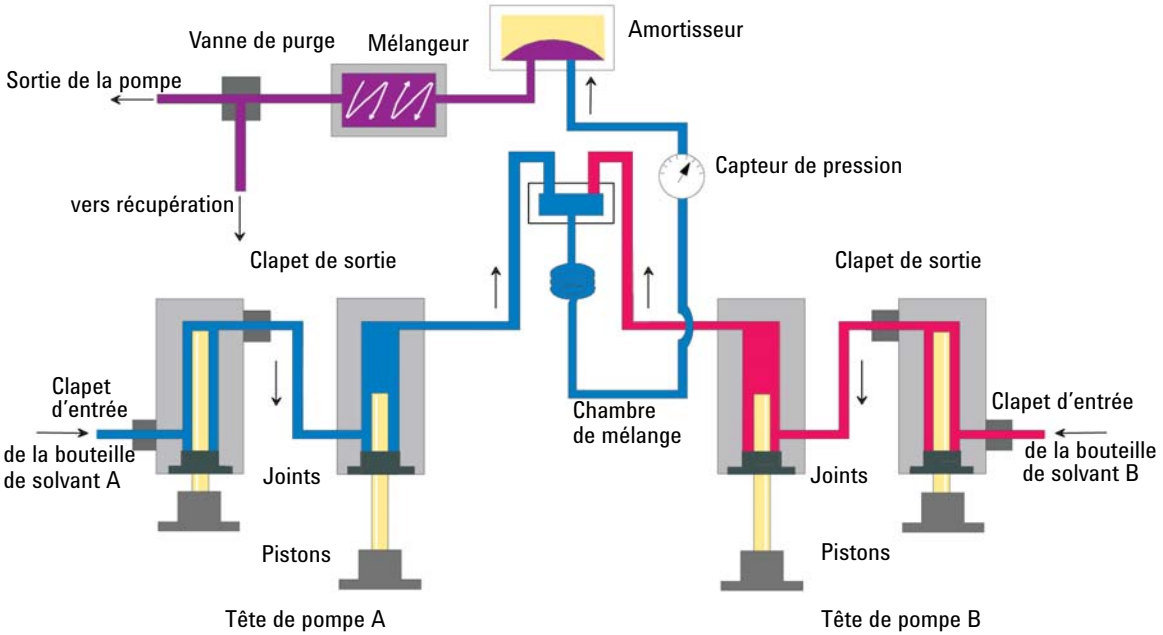


Figure 1 Circuit hydraulique de la pompe binaire avec amortisseur et mélangeur

L'amortisseur et le mélangeur peuvent être déconnectés pour obtenir le volume de retard le plus faible de la pompe binaire. Cette configuration est recommandée pour des applications à faible débit caractérisées par de forts gradients.

Figure 2, page 13 représente le circuit en mode faible volume de retard. Pour des instructions sur la commutation d'une configuration à l'autre, consultez le mode d'emploi de la G pompe binaire 1312B .

REMARQUE Le contournement du mélangeur alors que l'amortisseur reste connecté n'est pas une configuration prise en charge et risque d'entraîner un comportement incorrect de la pompe binaire.

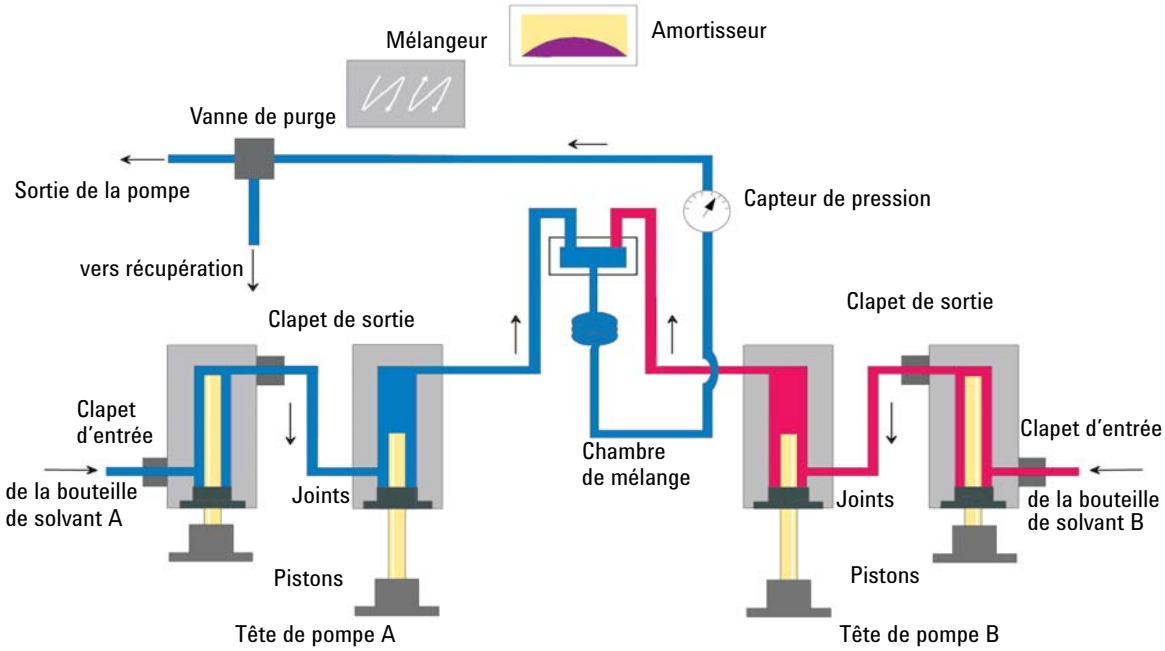


Figure 2 Circuit hydraulique de la pompe binaire SL avec amortisseur et mélangeur déconnectés

Dégazeur haute performance 1260 Infinity (G4225A)

Le dégazeur haute performance Agilent 1260 Infinity , modèle G4225A, est composé de quatre chambres à vide séparées avec des tuyaux semi-perméables, une pompe à vide et un ensemble de contrôle. Quand le dégazeur à vide est allumé, l'ensemble de contrôle active la pompe à vide qui génère une basse pression dans les chambres à vide. La pression est mesurée par un capteur de pression. Le dégazeur à vide maintient la basse pression à l'aide d'une fuite contrôlée dans le filtre d'entrée d'air et une régulation de la pompe à vide à l'aide du capteur de pression.

La pompe CPL prélève les solvants de leurs bouteilles à travers les tuyaux semi-perméables des chambres à vide. Quand les solvants passent à travers les chambres à vide, tout gaz dissout dans les solvants pénètre à travers les tuyaux dans les chambres à vide. Les solvants sont dégazés lorsqu'ils quittent les sorties du dégazeur à vide.

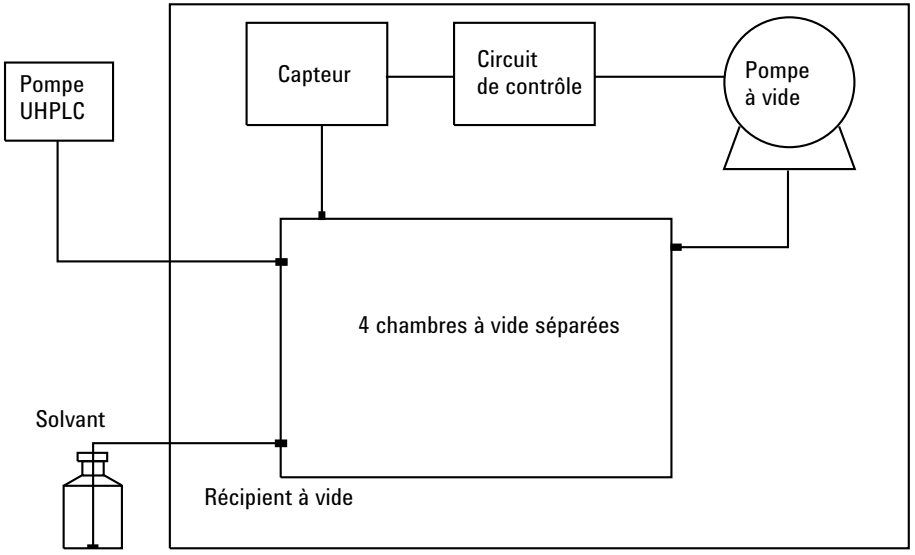


Figure 3 Vue d'ensemble (seule une des quatre voies de solvant est montrée)

Échantillonneur automatique haute performance 1260 Infinity (G1367E)

Caractéristiques

L'échantillonneur automatique haute performance 1260 Infinity possède une plus grande plage de pression (jusqu'à 600 bar) permettant l'utilisation de la technologie de colonne actuelle (colonnes de petit diamètre sub-2-microniques) avec le Binary LC Agilent 1260 Infinity. Une meilleure solidité est obtenue avec de nouvelles pièces optimisées, une haute vitesse avec le plus bas primage par le flux grâce à la conception, une plus grande vitesse d'injection d'échantillon pour un haut débit d'échantillon, une meilleure productivité à l'aide du mode d'injection chevauchant et une manipulation pratique de l'échantillon avec différents types de conteneurs d'échantillons, tels que des flacons et des plaques à puits. L'utilisation de plaques à 384 puits vous permet de traiter jusqu'à 768 échantillons sans surveillance.

Principe de l'échantillonneur automatique

Au cours de la séquence d'échantillonnage, les mouvements des composants de l'échantillonneur automatique sont suivis en permanence par le processeur de l'échantillonneur automatique. Pour chaque déplacement, le processeur définit des laps de temps et des plages mécaniques spécifiques. Si une étape de la séquence d'échantillonnage ne s'effectue pas de manière satisfaisante, un message d'erreur le signale. Pendant la séquence d'échantillonnage, la vanne d'injection court-circuite l'échantillonneur automatique. L'aiguille se place dans la position d'échantillon souhaitée et descend dans le liquide de l'échantillon pour permettre au dispositif doseur d'aspirer le volume souhaité en reculant le piston d'une certaine distance. L'aiguille est ensuite relevée et déplacée dans le siège pour fermer la boucle d'échantillonnage. L'échantillon est injecté dans la colonne quand la vanne d'injection revient en position de voie principale, à la fin de la séquence d'échantillonnage.

La séquence d'échantillonnage standard s'effectue comme suit :

1. La vanne d'injection se met en position de dérivation.
2. Le piston du dispositif doseur se met en position d'initialisation.
3. Le blocage de l'aiguille monte.
4. L'aiguille se déplace dans la position de flacon d'échantillon (ou plaque à puits) souhaitée.

5 L'aiguille descend dans le flacon d'échantillon (ou la plaque à puits).

6 Le dispositif doseur prélève le volume d'échantillon défini.

7 L'aiguille remonte hors du flacon d'échantillon (ou la plaque à puits).

8 L'aiguille est ensuite déplacée dans le siège pour fermer la boucle d'échantillonnage.

9 Le blocage de l'aiguille descend.

10 Le cycle d'injection est terminé quand la vanne d'injection passe en position de voie principale.

Si un lavage d'aiguille est requis, il est effectué entre les étapes 7 et 8.

Séquence d'injection

Avant le début de la séquence d'injection et pendant une analyse, la vanne d'injection est en position de voie principale. Dans cette position, la phase mobile circule à travers le dispositif doseur, la boucle d'échantillonnage et l'aiguille de l'échantillonneur automatique, ce qui garantit que toutes les pièces en contact avec l'échantillon sont rincées au cours de l'analyse afin de réduire au minimum le transfert.

Lorsque la séquence d'échantillonnage commence, la vanne bascule en position de dérivation. Le solvant provenant de la pompe entre dans la vanne au niveau du port 1 et s'écoule directement vers la colonne par le port 6.

L'étape finale de l'échantillonnage est l'étape d'injection et d'analyse. La vanne à six voies est commutée en position de voie principale et redirige le flux à travers la boucle d'échantillonnage, qui contient à présent une certaine quantité d'échantillon. Le flux de solvant transporte l'échantillon sur la colonne et la séparation commence. C'est le début d'une analyse dans l'analyse. À ce stade, tout le matériel ayant une influence sur la performance est rincé en interne par le flux de solvant. Aucune procédure de rinçage supplémentaire n'est requise pour les applications standard.

Rincez l'aiguille.

Avant l'injection et pour réduire le transfert pour les analyses très sensibles, l'extérieur de l'aiguille peut être lavé dans un port de rinçage derrière le port de l'injecteur sur l'unité d'échantillonnage. Dès que l'aiguille est sur le port de rinçage, une pompe péristaltique fournit du solvant pendant un temps défini pour nettoyer l'extérieur de l'aiguille. À la fin de ce processus, l'aiguille retourne au port d'injection.

Compartiment à colonnes thermostaté 1290 Infinity (G1316C)

Le compartiment à colonnes thermostaté Agilent Infinity 1290 (CCT) maintient une température comprise entre 10 °C en dessous de la température ambiante et jusqu'à 100 °C à un débit de 2,5 ml/min et 80 °C à un débit allant jusqu'à 5 ml/min, respectivement. La stabilité de la température est de ±0,05 °C et la précision de la température est de ±0,5 °C (avec étalonnage).[1]. La thermostatisation est atteinte par l'action combinée de la conduction par contact avec les ailettes du thermostat, de la température de l'air non ventilé du compartiment et surtout du préchauffage (ou refroidissement) de la phase mobile lors de son passage à travers un échangeur de chaleur avant de pénétrer dans la colonne. Il existe deux zones de température indépendantes dans chaque TCC qui peuvent fonctionner de concert pour des colonnes longues jusqu'à 300 mm ou à des températures distinctes pour des colonnes courtes de 100 mm ou moins.

Le module est fourni avec un échangeur de chaleur à faible dispersion de 1,6 µl. Chaque kit de vannes comprend des échangeurs de température à faible dispersion supplémentaire pour chaque colonne. Un maximum de quatre échangeurs de température à faible dispersion peuvent être installés de façon flexible à l'intérieur du TCC. Pour un fonctionnement HPLC conventionnel, des échangeurs de température intégrés de 3 µl et de 6 µl sont également disponibles.

Chaque CCT peut accueillir une commande de vanne interne pour faciliter les opérations de permutation entre différents types d'applications : permutation entre deux colonnes, régénération de colonne alternative, préparation d'échantillons ou rétrolavage de colonne. Chaque tête de vanne est fournie sous la forme d'un kit complet contenant tous les capillaires nécessaires, des échangeurs de température à faible dispersion supplémentaires et d'autres pièces.

Les vannes d'inversion sont d'une facilité d'utilisation exceptionnelle et offrent une grande flexibilité pour les raccordements : sur simple pression, l'unité de commande de la vanne à remplacement rapide se coulisse vers l'avant, permettant un accès facile (voir Figure 4, page 18, à gauche). Les différentes têtes de vanne peuvent être échangées par l'utilisateur et positionnées sur le mécanisme de commande en fonction du type d'application souhaité (voir Figure 4, page 18, à droite). Une étiquette RFID identifie chaque tête de vanne.

[1] Ces spécifications ont été validées avec de l'eau distillée à une température ambiante de 25 °C, un point de consigne de 40 °C et une plage de débit de 0,2 à 5 mL/min.

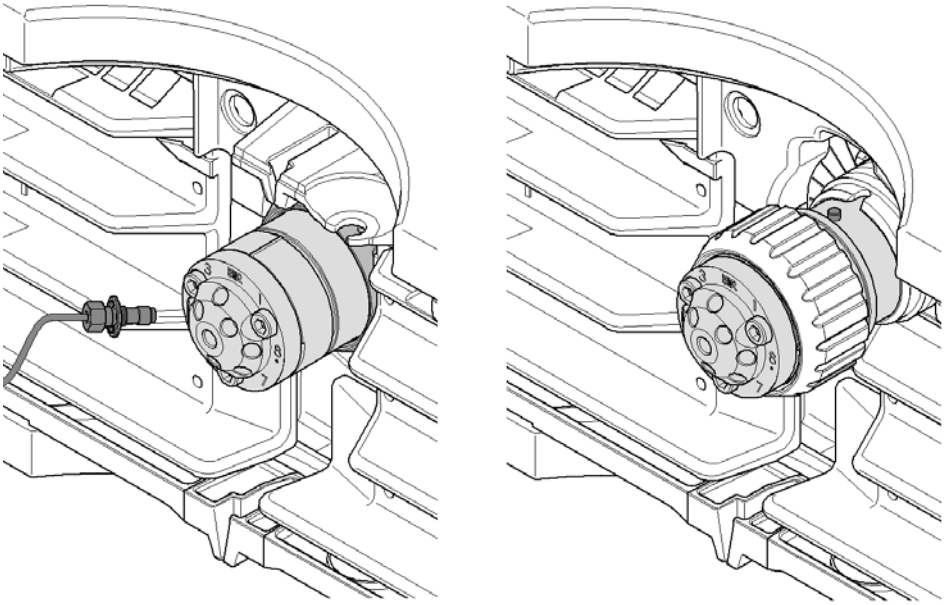


Figure 4 Vanne à remplacement rapide sur le TCC

Jusqu'à trois TCC peuvent être regroupés pour permettre des opérations complexes telles que la permutation entre huit colonnes pour le développement de méthodes automatisé, ou lorsqu'il est souhaitable que des colonnes supplémentaires soient disponibles pour différentes applications. De cette façon, la colonne à utiliser devient un paramètre de méthode simple. Cette configuration requiert deux têtes de vanne à 8 positions/9 voies, une dans deux des TCC. Pour faciliter leur utilisation, les TCC regroupés sont représentés dans le logiciel sous la forme d'une unité unique avec une seule interface.

Par rapport à des modèles plus anciens, d'autres améliorations sont le renforcement de l'isolation thermique, des guides à capillaire mieux adaptés et un capteur d'ouverture de la porte pour que les méthodes puissent intégrer le paramètre « porte fermée » (particulièrement utile pour les méthodes à température élevée ou basse).

Détecteur à barrette de diodes 1260 Infinity (G4212B)

Le système optique du détecteur à barrette de diodes 1260 Infinity (DAD) est de conception innovante avec une cuve de type cartouche incorporant la technologie de guide d'ondes optofluidique. Il offre une sensibilité élevée avec une faible dispersion, une plage linéaire étendue et une ligne de base très stable pour les applications CPL standard ou ultra rapides. La cuve de type cartouche Agilent Max-Light augmente de manière importante la transmission de la lumière selon le principe de réflexion interne totale le long d'un capillaire en verre de silice non recouvert. Un nouveau niveau de sensibilité est ainsi atteint sans perdre en résolution en raison d'effets de dispersion de la cuve. Ce format réduit au minimum les variations de la ligne de base provoquées par l'indice de réfraction ou des effets thermiques et permet une intégration plus fiable de l'aire des pics.

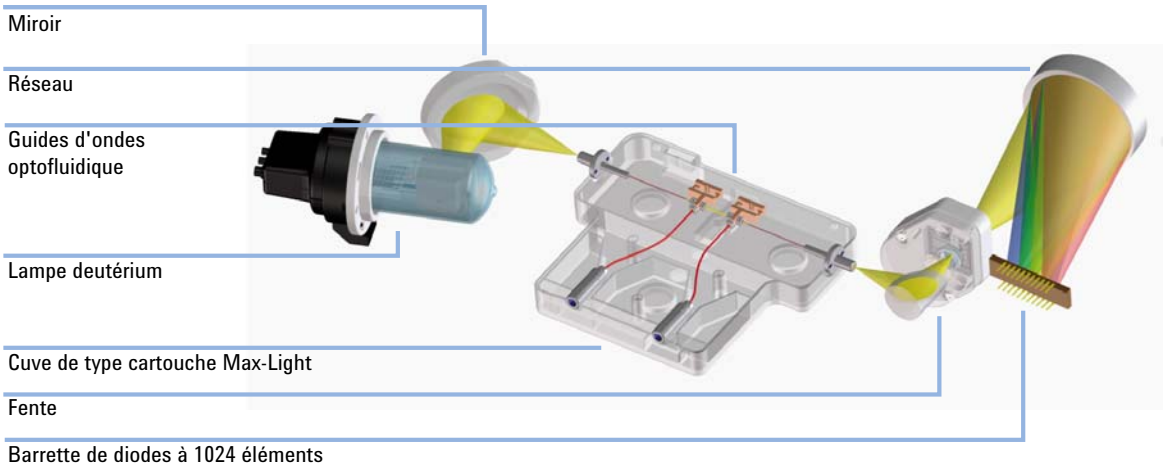


Figure 5 Le faisceau lumineux à travers le DAD

Ce module comprend aussi une régulation de la température électronique pour améliorer encore la résistance aux effets dus à des variations de la température ambiante. Bien que le volume hydraulique de la cuve de type cartouche Max-Light soit très petit, la longueur du trajet est standard, soit 10 mm. Toutefois, pour des sensibilités encore supérieures, la cuve Agilent Max-Light haute sensibilité est disponible, avec une longueur du trajet de 60 mm. Les cuves peuvent être remplacées aisément en les faisant coulisser dans le porte-cuve ; elles sont alignées automatiquement au niveau du banc optique. La source de lumière du DAD est une lampe deutérium ; la plage de longueurs

d'onde de fonctionnement est comprise entre 190 et 640 nm. La détection s'effectue au moyen d'une barrette à 1024 diodes. L'entrée du spectrographe est une fente optique fixe de 4 nm.

Les signaux chromatographiques sont extraits des données de la barrette de diodes par le micrologiciel du module. Vous pouvez paramétrer jusqu'à huit signaux individuels. Chacun d'entre eux comprend une longueur d'ondes de signal, une bande passante de paquet de diodes et, s'il y a lieu, une longueur d'ondes et une bande passante de référence. Les signaux peuvent être émis à 80 Hz (80 points de données/seconde) pour un enregistrement précis des pics chromatographiques les plus rapides (étroits). En même temps le module peut aussi envoyer le spectre complet au système de données à la même vitesse, soit 80 Hz.

Il est important que les paramètres des méthodes puissent être enregistrés pour les laboratoires réglementés. Le DAD 1260 Infinity enregistre non seulement les points de consigne de l'instrument mais est également doté d'étiquettes RFID (étiquettes d'identification par radiofréquence) intégrées à la lampe et à la cartouche de la cuve à circulation pour que l'identité et les caractéristiques de ces composants importants soient également enregistrées par le système.

Vannes à remplacement rapide 1200 Infinity

Les vannes à remplacement rapide Agilent 1200 Infinity prennent en charge différentes applications de vannes difficiles. Chaque tête de vanne est fournie sous la forme d'un kit complet contenant tous les capillaires nécessaires, des échangeurs de température à faible dispersion supplémentaires et d'autres pièces.

Voici quelques applications typiques de vannes à remplacement rapide :

- Sélection de deux colonnes
- Enrichissement de l’échantillon
- Rinçage de l’échantillon
- Alterner la régénération des colonnes
- Applications spéciales, comme le développement de méthode ou 2D-LC

Pour des descriptions détaillées de ces applications, veuillez consulter le mode d'emploi des solutions de vanne.

Caractéristiques

La conception modulaire du Binary LC 1260 Infinity vous permet de configurer un système qui répond exactement aux besoins de votre application personnelle. Cette configuration individuelle peut être différente de la configuration standard décrite dans ce mode d'emploi du système.

Les caractéristiques physiques et performances de la pompe binaire 1260 Infinity figurent ci-dessous. Des informations relatives aux spécifications des autres modules de votre système se trouvent dans les modes d'emploi des modules respectifs.

Caractéristiques physiques de la pompe binaire 1260 Infinity (G1312B)

Tableau 1 Caractéristiques physiques

Type	Spécification	Commentaires
Poids	15,5 kg	
Dimensions (hauteur × largeur × profondeur)	180 x 345 x 435 mm	
Tension secteur	100 – 240 VAC, ± 10 %	Plage de tensions étendue
Fréquence secteur	50 ou 60 Hz, ± 5 %	
Puissance consommée	220 VA, 74 W / 253 BTU	Maximum
Température ambiante de fonctionnement	4–55 °C	
Température ambiante hors fonctionnement	-40 – 70 °C	
Humidité	< 95 % à 40 °C	Sans condensation
Altitude de fonctionnement	Jusqu'à 2000 m	
Altitude hors fonctionnement	Jusqu'à 4600 m	Pour l'entreposage du module
Normes de sécurité : CEI, CSA, UL	Catégorie d'installation II, degré de pollution 2	Utilisation intérieure uniquement.

Caractéristiques de performance

Tableau 2 Caractéristiques des performances de la pompe binaire Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Type	Spécification	Commentaires
Système hydraulique	Deux pistons doubles dans des pompes en série avec un entraînement des pistons variable asservi, transmission de puissance par des engrenages et vis à billes, pistons flottants	
Plage de débit réglable	Points de consigne de 0,001 – 5 mL/min, en incréments de 0,001 mL/min	
Plage de débit	0,05 – 5,0 mL/min	
Précision du débit	≤0,07 % écart-type relatif, ou ≤0,02 min écart-type, la valeur la plus grande	basée sur le temps de rétention à température ambiante constante
Précision de débit	± 1 % ou 10 µL/min, la valeur la plus grande	pompage de H_2O dégazée à 10 MPa (100 bar)
Pression, plage de fonctionnement	Plage de fonctionnement 0 – 60 MPa (0 – 600 bar, 0 – 8700 psi) jusqu'à 5 mL/min	
Pulsation de pression	< 2 % amplitude (classiquement < 1,3 %), ou < 0,3 MPa (3 bar), la valeur la plus grande, à 1 mL/min d'isopropanol, pour toute pression > 1 MPa (10 bar, 147 psi) *Configuration faible volume de retard :* < 5 % amplitude (typiquement < 2 %)	
Compensation de la compressibilité	Prédéfinie, en fonction de la compressibilité de la phase mobile	
Gamme de pH recommandée	1,0 – 12,5 , les solvants de pH < 2,3 ne doivent pas contenir d'acide attaquant l'acier inoxydable	
Formation du gradient	Mélange binaire sous haute pression	

Tableau 2 Caractéristiques des performances de la pompe binaire Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Type	Spécification	Commentaires
Volume de retard	*Configuration volume de retard standard :* 600 – 800 µL, (comprend 400 µL de mélangeur), en fonction de la contrepression *Configuration faible volume de retard :* 120 µL	mesuré avec de l'eau à 1 mL/min (traceur de caféine/eau)
Plage de composition	plage réglable : 0 – 100 % plage recommandée : 1 – 99 % ou 5 µL/min par voie, la valeur la plus grande	
Précision de la composition	< 0,15 % écart-type relatif, ou 0,04 min écart-type, la valeur la plus grande	à 0,2 et 1 mL/min ; basée sur le temps de rétention à température ambiante constante
Exactitude de la composition	± 0,35 % absolu, à 2 mL/min, à 10 MPa (100 bar)	(traceur de caféine/eau)
Commande	Logiciel de contrôle des données Agilent (par exemple, ChemStation, EZChrom, OL, MassHunter)	
Contrôle local	Agilent Instant Pilot	Version B.02.00 ou supérieure
Sortie analogique	Pour surveiller la pression, 1,33 mV/bar, une sortie	
Communications	Bus CAN, RS-232C, commande à distance APG : signaux prêt, démarrage, arrêt et arrêt système ; LAN en option	
Sécurité et maintenance	Une assistance complète pour le dépannage et la maintenance est fournie par Instant Pilot, Agilent Lab Advisor et le système de données chromatographiques. Les fonctions de sécurité sont la détection des fuites, le traitement des fuites, le signal de sortie des fuites pour fermeture du système de pompage et les basses tensions dans les zones de maintenance principales.	

Tableau 2 Caractéristiques des performances de la pompe binaire Agilent 1260 Infinity (G1312B)

Type	Spécification	Commentaires
Fonctionnalités BPL	Retour d'informations (EMF) pour le suivi en continu de l'instrument pour ce qui est de l'usure des joints, du volume de phase mobile pompé (les limites étant prédéfinies et réglables par l'utilisateur) et des messages en retour. Enregistrement électronique des travaux de maintenance et des erreurs	
Boîtier	Tous les matériaux sont recyclables	

REMARQUE

Un dégazeur à vide est requis pour une utilisation à des débits inférieurs à 500 µl/min ou pour une utilisation sans amortisseur ni mélangeur.

Toutes les mesures contenues dans les spécifications ont été réalisées avec des solvants dégazés.

2
Introduction

Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide 28

Avantages des colonnes à petites particules 34

Échauffement par frottement 37

Ce chapitre présente le Binary LC Agilent 1260 Infinity et ses principes de fonctionnement.

Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide

Introduction

En 2003, Agilent a commercialisé ses premières colonnes en silice totalement poreuse avec des particules de 1,8 µm.

En combinaison avec le Binary LC Agilent 1260 Infinity, les deux colonnes à particules d'une taille sub-2-micronique (1,8 µm) peuvent être utilisées pour atteindre deux objectifs principaux :

1 Une chromatographie plus rapide

   Des colonnes courtes contenant des particules sub-2-microniques permettent de réduire de manière dramatique la durée de l'analyse en augmentant le débit sans toutefois perdre au niveau de la performance.

2 Une résolution plus élevée

   Des colonnes longues contenant des particules sub-2-microniques offrent une meilleure efficacité et donc la résolution plus élevée nécessaire pour la séparation d'échantillons complexes.

La pression requise pour faire avancer le solvant à travers une colonne contenant des particules STM (sub-2-microniques) s'accroît rapidement lorsque le débit est augmenté dans le but d'accélérer une séparation, et très rapidement lorsque la longueur de la colonne est augmentée dans le but d'améliorer la résolution. Ainsi, le développement de systèmes UHPLC a accompagné la commercialisation des colonnes STM. Ces systèmes ultra-HPLC permettent d'appliquer des pressions supérieures à 400 bar, valeur qui représentait un seuil non franchi depuis les débuts de la technique HPLC.

Aujourd'hui, Agilent propose le CPL 1290 Infinity pour les exigences UHPLC les plus élevées avec des pressions jusqu'à 1200 bar.

La théorie

L'efficacité de séparation en HPLC peut être décrite par l'équation de van Deemter (Figure 6, page 29). Cette équation découle du modèle de hauteur de plateau utilisé pour mesurer la dispersion des analytes lors de leur progression à l'intérieur de la colonne. H est la hauteur équivalente à un plateau théorique (appelée parfois HETP), d_p est la taille des particules de remplissage de la colonne, u_0 est la vitesse linéaire de la phase mobile et A, B et C sont des constantes associées aux différentes forces de dispersion. La constante A correspond à la diffusion turbulente ou les multiples trajets d'écoulement à travers la colonne ; B correspond à la diffusion moléculaire (longitudinale) le long de l'axe de la colonne ; C correspond au transfert de masse de l'analyte entre les phases mobile et stationnaire. La séparation est la plus efficace lorsque H atteint sa valeur minimale. Les effets de chacune des variables et de l'équation combinée sont illustrés dans la Figure 6, page 29 où la hauteur du plateau est fonction du débit linéaire à travers la colonne. Ce type de graphique est connu sous le nom de Courbe de van Deemter et est utilisé pour déterminer le débit optimal (au point le plus bas de la courbe) permettant d'obtenir la meilleure efficacité de séparation d'une colonne.

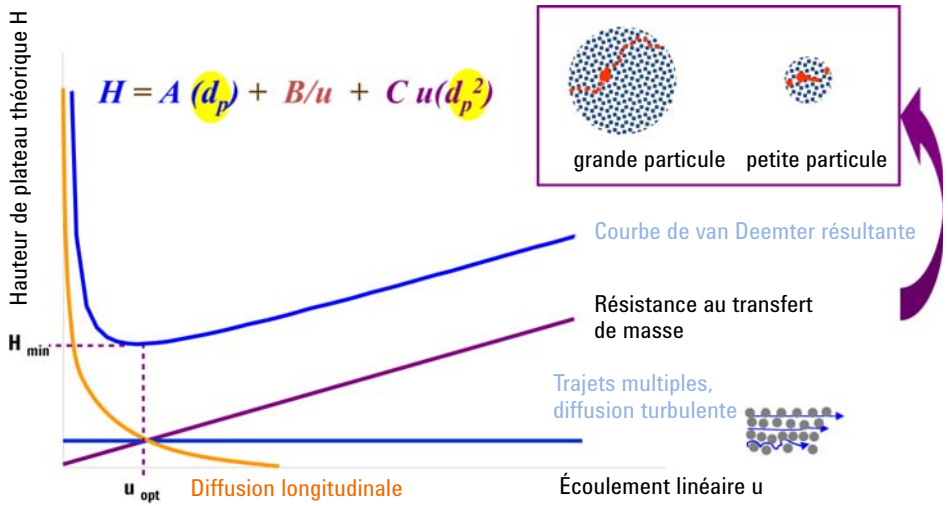


Figure 6 Courbe de van Deemter hypothétique

Les courbes de van Deemter de la Figure 7, page 30 montrent comment la réduction de la taille des particules améliore l'efficacité. Le fait de passer d'une taille de particules habituelle telle que 3,5 µm ou 5,0 µm à des particules de 1,8 µm permet d'améliorer les performances de façon significative. Les valeurs de hauteur du plateau sont deux à trois fois plus petites avec des particules de 1,8 µm, et ce avec une efficacité proportionnellement plus élevée. Cela permet l'utilisation d'une colonne plus courte sans perdre en résolution ; ainsi la durée de l'analyse est également divisée par un facteur deux à trois. L'augmentation de l'efficacité est en grande partie due au nombre réduit de trajets d'écoulement différents en raison de la taille réduite des particules : la valeur de la constante A est plus petite (diffusion turbulente). De surcroît, une taille de particules plus petite signifie que les durées de transfert de masse sont plus courtes, diminuant ainsi la valeur de la constante C. L'effet global est une réduction importante de la perte de l'efficacité lorsque le débit augmente (la pente de la courbe est moins forte). Cela signifie que l'utilisation de particules plus fines permet d'accélérer encore la séparation en augmentant le débit sans toutefois perdre significativement en efficacité.

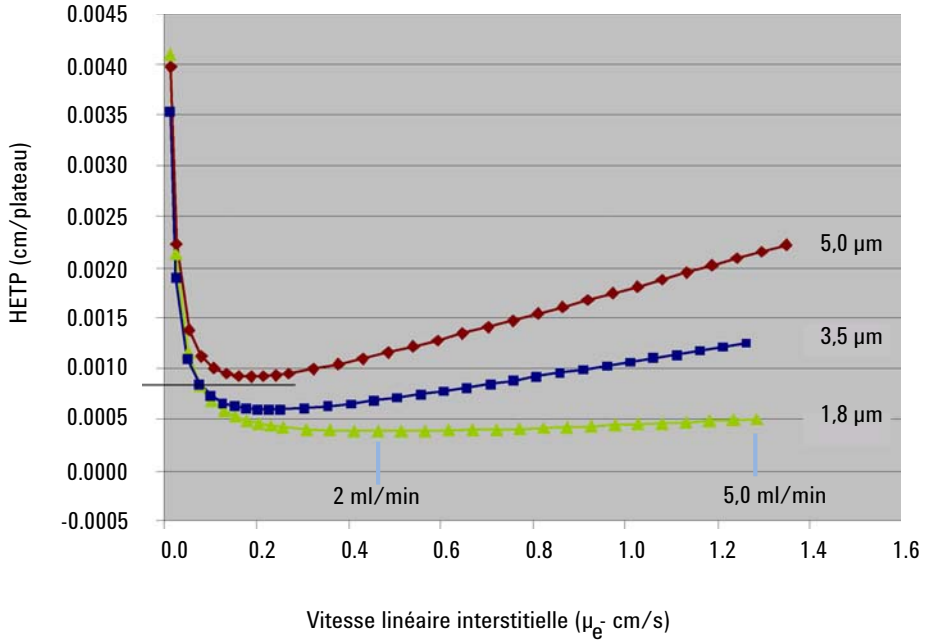


Figure 7 Courbe de van Deemter pour des tailles de particules différentes

La séparation chromatographique peut être optimisée sur la base des caractéristiques physiques de la colonne HPLC telles que la taille des particules, le diamètre des pores, la morphologie des particules, la longueur et le diamètre de la colonne, la vitesse du solvant et la température. De surcroît, la thermodynamique d'une séparation chromatographique peut être prise en compte afin de modifier les propriétés du soluté et des phases mobile et stationnaire (pourcentage de solvant organique, force ionique, pH) pour obtenir le temps de rétention le plus court possible et la sélectivité la plus élevée.

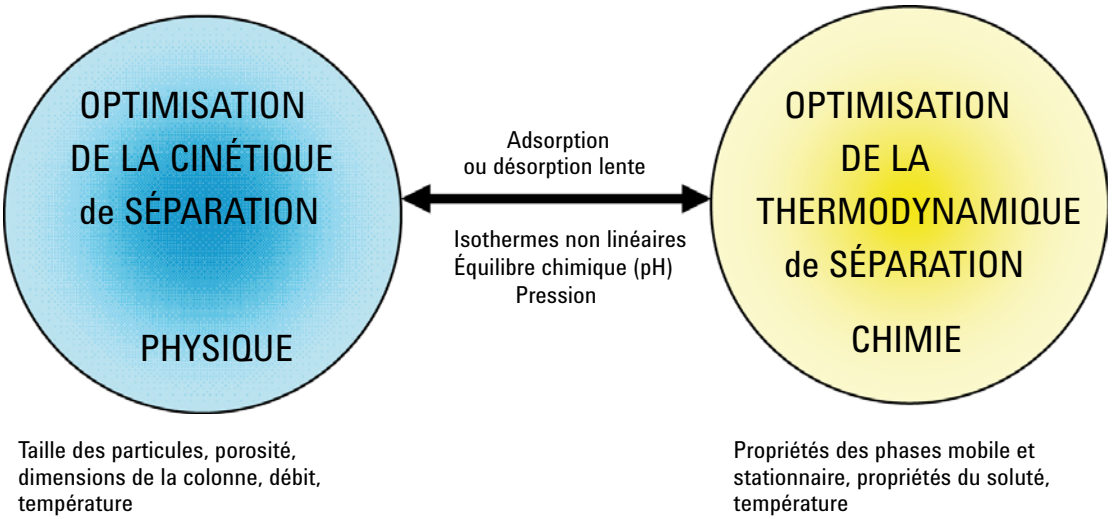


Figure 8 Sélection des conditions de HPLC optimales

La résolution peut être décrite dépendant de trois paramètres :

- l'efficacité ou les plateaux théoriques (N) de la colonne,
- la sélectivité (α),
- le facteur de rétention (k).

D'après l'équation de la résolution (Figure 9, page 32), la sélectivité est le paramètre ayant l'influence la plus forte sur la résolution (Figure 10, page 32). Cela signifie qu'il est indispensable de choisir des propriétés de phase mobile et de phase stationnaire ainsi qu'une température adéquates pour réussir la séparation.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right] \cdot \left[\frac{k_2'}{k_2' + 1}\right]$$

Figure 9 Équation de résolution

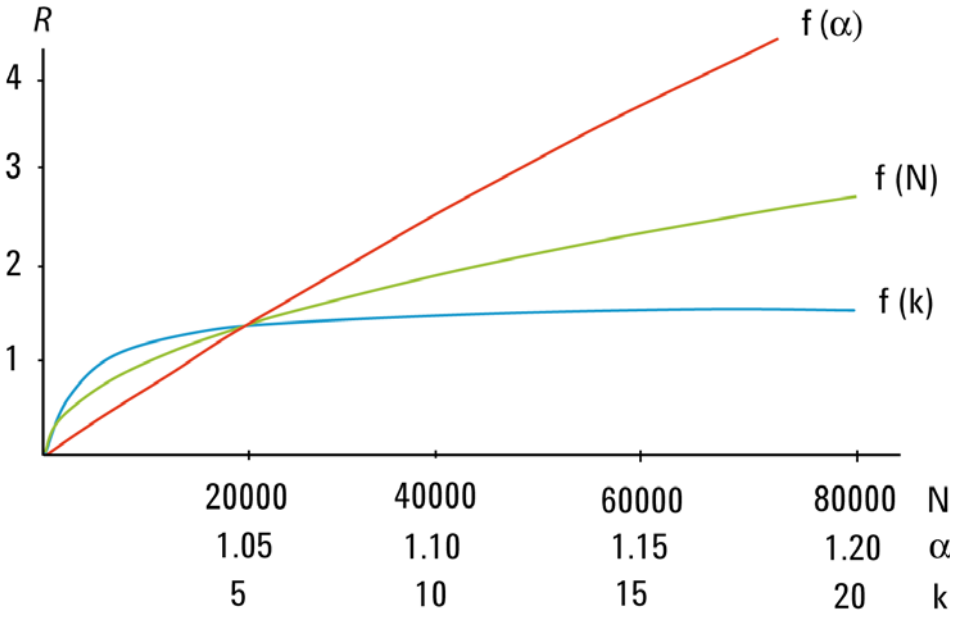


Figure 10 Effet du nombre de plateaux, du facteur de séparation et du facteur de rétention sur R

Que la méthode de séparation UHPLC soit nouvelle ou simplement transférée à partir d'un protocole conventionnel existant, il est clair qu'il est nécessaire de disposer d'une gamme étendue de phases stationnaires aux propriétés différentes avec de nombreux formats de colonne.

Agilent propose plus de 140 colonnes ZORBAX 1,8 µm à résolution rapide et haut débit (RRHT) (14 niveaux de sélectivité, longueur de 15 à 150 mm et diamètres internes de 2,1 , 3,0 et 4,6 mm).

En plus des colonnes ZORBAX, des colonnes PoroShell avec neuf niveaux de sélectivité sont disponibles pour une utilisation avec le Binary LC Agilent 1260 Infinity.

Cela permet de sélectionner la phase stationnaire optimale pour atteindre une sélectivité maximale. La résolution, le débit et la durée d'analyse peuvent être optimisés en choisissant une longueur et un diamètre de colonne appropriés rendant l'utilisation des colonnes STM encore plus facile qu'avant.

Les colonnes PoroShell sont des colonnes à particules superficiellement poreuses (SPP). Contrairement aux colonnes en silice totalement poreuse, ces colonnes SPP ont un centre solide (1,7 µm de diamètre) entouré d'une couche de silice poreuse (0,5 µm d'épaisseur). La vitesse et la résolution des colonnes PoroShell est comparable aux colonnes sub-2-microniques avec jusqu'à 50 % de contrepression en moins. Les colonnes PoroShell bénéficient d'une résurgence récente de particules de plus petite taille que les anciennes colonnes à particules « pelliculaires ». L'intérêt actuel pour cette technologie est favorisé par sa réutilisation dans les particules de plus petites tailles, comme les tailles sub-3-microniques, pour les séparations de petites molécules en phase inverse typiques.

De nombreux laboratoires réalisent un processus de sélection approfondi pour définir la meilleure combinaison de phase stationnaire, de phase mobile et la température optimale pour leurs séparations chromatographiques. La solution de développement à méthodes multiples Agilent 1200 Infinity facilite l'automatisation de l'intégralité de ce processus de sélection très long, ce qui rend plus simple et plus fiable le développement et le transfert de méthodes.

Les colonnes ZORBAX RRHT de 1,8 µm ont les mêmes propriétés chimiques que les colonnes ZORBAX avec des particules de 3,5 et 5 µm. En conséquence, pour toute phase ZORBAX donnée, la sélectivité des particules de 5,0 , 3,5 et 1,8 µm est identique, permettant ainsi un transfert de méthodes bidirectionnel aisé, rapide et sécurisé entre la CPL conventionnelle et l'UHPLC.

Avantages des colonnes à petites particules

Une chromatographie plus rapide

Le fait d'avoir des durées d'analyse plus courtes présente plusieurs avantages. La capacité d'analyse des laboratoires utilisant des systèmes à haut débit s'en trouve améliorée et plus d'échantillons peuvent être analysés dans un temps moins long. Plus d'échantillons en moins de temps signifie aussi des coûts moins élevés. Par exemple, en diminuant le temps d'analyse de 20 min par échantillon à 5 min, le coût pour 700 échantillons est réduit de 79 % (Tableau 3, page 34).

Tableau 3 Économies de temps et de coût sur plus de 700 analyses

Durée de cycle	Durée de cycle de 20 min	Durée de cycle de 5 min
Analyses	700	700
Coût approx. par analyse [1]	$ 10,58	$ 2,24
Coût approx. pour 700 analyses[1]	$ 7400	$ 1570
Économies de coûts	-	$ 5830
Temps[2]	10 jours	2,5 jours

[1] solvants = $ 27/l, élimination des déchets = $ 2/l, main d'œuvre = $ 30/h

[2] 24 heures/jour

Le calculateur d'économies Agilent représente un outil d'utilisation facile pour calculer les économies générées par le passage d'un système HPLC conventionnel à un système UHPLC équipé de colonnes contenant des particules de 1,8 µm. Le calculateur, ainsi qu'un calculateur de transfert de méthode, est accessible sur le site Internet d'Agilent Technologies – www.chem.agilent.com. Les résultats sont présentés sous forme de graphique et de tableau.

Des durées d'analyse plus courtes permettent également d'obtenir des plus réponses plus rapides. Ceci est important lors du contrôle du processus et des analyses de libération rapide. Au lieux d'attendre des heures pour libérer un lot unique de médicament, toutes les analyses concernant l'adéquation du sys-

tème, l'étalonnage et l'échantillon peuvent être effectuées en moins d'une heure. Des réponses rapides sont importantes également pour les chercheurs en chimie de synthèse utilisant des systèmes CPL/MS en libre accès pour valider l'identité de leurs composés et contrôler leurs réactions. Des durées d'analyse plus courtes permettent aussi d'accélérer de façon significative le processus de développement des méthodes.

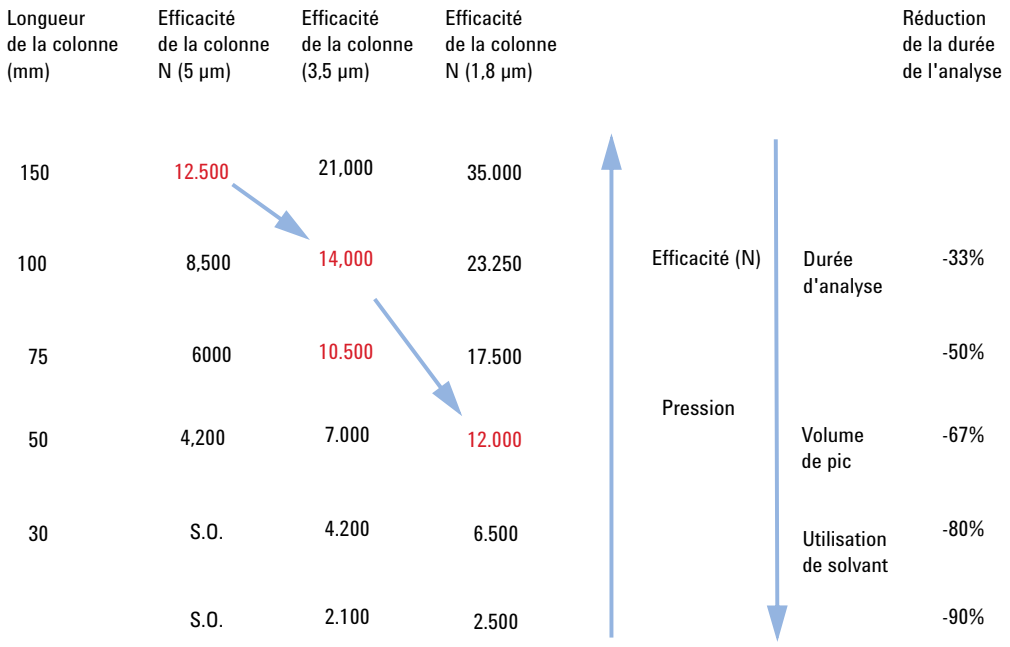


Figure 11 Relation entre la taille des particules, l'efficacité et la durée d'analyse

Le temps d'analyse peut être réduit, sans sacrifier l'efficacité de la colonne, en optimisant la taille de particule et la pression.

Une résolution plus élevée

L'utilisation de colonnes longues remplies de particules plus fines aboutit à une efficacité et une résolution plus élevées. Cela est essentiel pour l'analyse des échantillons complexes provenant d'études métabolomiques ou protéomiques. De même, des applications comme la détermination du profil des impuretés bénéficient d'un pouvoir de séparation plus élevé. Une capacité de pics plus élevée est avantageuse même pour l'analyse CPL/MS de médicaments dans les liquides biologiques en raison d'interférences réduites dues à la suppression ionique. D'une manière générale, un pouvoir de séparation accru apporte une plus grande confiance dans les résultats analytiques.

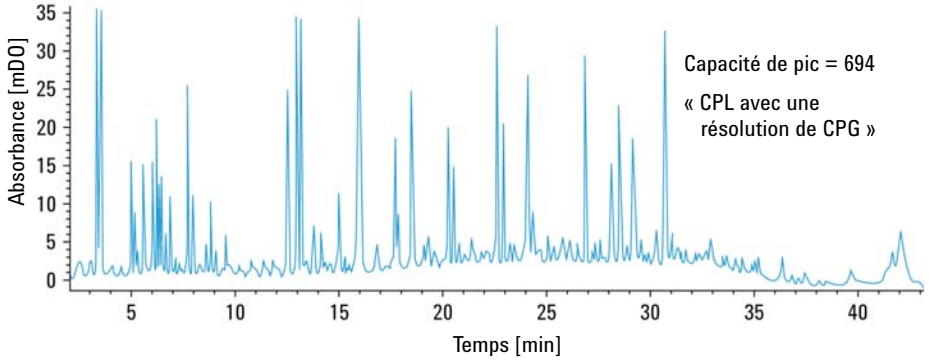


Figure 12 Une capacité de pics de plus de 700 peut être atteinte avec une colonne ZORBAX RRHT SB-C18 (2,1 x 150 mm, 1,8 µm) pour l'analyse de BSA digérée par la trypsine.

Échauffement par frottement

Faire progresser une phase mobile à travers une colonne à des pressions et débits plus élevés génère de la chaleur. Les gradients de température ainsi créés (radial et longitudinal) peuvent influencer l'efficacité de la colonne.

$$Power = F * p$$

où F est le débit et p est la pression.

Des dispositifs de thermostatisation puissants (par exemple l'immersion de la colonne dans un bain marie) génèrent un fort gradient de température radial, ce qui conduit à une baisse signicative de l'efficacité de la colonne. La thermostatisation de la colonne à l'air non ventilé réduit le gradient de température radial et donc la baisse d'efficacité, mais la température de sortie de la colonne s'en trouve augmentée. Cette élévation de température peut avoir un effet sur la sélectivité. À contrepression inférieure, les pertes en performance dues à l'échauffement par frottement sont minimisées de façon à ce que l'efficacité des colonnes sub-2-microniques de diamètre interne de 4,6 ou 3 mm reste toujours supérieure à celle des colonnes correspondantes de diamètre interne de 2,1 mm.

En résumé, l'utilisation d'un matériau de remplissage sub-2-micronique permet d'améliorer l'efficacité et la résolution, et d'accélérer les séparations.

Les caractéristiques du Binary LC Agilent 1260 Infinity sont décrites au chapitre *Description du produit*. Le chapitre *Optimisation* traite de la mise en application des données théoriques et de l'utilisation de ces caractéristiques pour développer des séparations optimisées.

3
Optimisation du Binary LC Agilent 1260 Infinity

Configuration d'un volume de retard optimal 40
Volume de retard et volume extra-colonne 40
Volumes de retard dans le Binary LC Agilent 1260 Infinity 42
Configuration optimale de l'instrument pour les colonnes de d.i. 2,1 mm 43
Configuration optimale de l'instrument pour les colonnes de d.i. 3 et 4,6 mm 45
Comment augmenter le volume d'injection 47
Comment obtenir des durées de cycle plus courtes 49
Comment améliorer la capacité d'analyse 52
Comment obtenir le transfert le plus bas 53
Comment améliorer la résolution 55
Configuration optimale de l'instrument pour une haute résolution 58
Comment améliorer la sensibilité 62
Configuration optimale de l'instrument pour une sensibilité élevée 63
Choix d'une cuve à circulation 65
Comment empêcher les obstructions de colonne 67

Ce chapitre traite de l'application des notions théoriques et de l'utilisation des caractéristiques du système CPL pour développer des séparations optimisées.

Configuration d'un volume de retard optimal

Volume de retard et volume extra-colonne

Le *volume de retard* est défini comme le volume du système entre le point de mélange dans la pompe et au sommet de la colonne.

Le *volume supplémentaire de la colonne* est défini comme le volume entre le point d'injection et le point de détection, à l'exclusion du volume dans la colonne.

Volume de retard

Dans les séparations du gradient, ce volume entraîne un retard entre le changement de mélange dans la pompe et ce changement atteignant la colonne. Le retard varie en fonction du débit et du volume de retard du système. En effet, cela signifie que, dans chaque système CPL, il y a un segment isocratique supplémentaire dans le profil du gradient au démarrage de chaque analyse. En général, le profil du gradient est rapporté en termes de réglages du mélange au niveau de la pompe, et le volume de retard n'est pas rapporté, même s'il a un effet sur la chromatographie. Cet effet devient plus significatif à faibles débits et faibles volumes de colonne, et il peut exercer un impact important sur la transférabilité des méthodes de gradient. Il est par conséquent important, pour les séparations rapides du gradient, d'avoir de faibles volumes de retard, plus particulièrement avec des colonnes de petits diamètres (par ex. 2,1 mm de diamètre interne), car elles sont souvent utilisées avec la détection spectrométrique de masse.

Par exemple, dans les méthodes CPL utilisant 5 µm de matériau d'emballage, des débits de 1 ml/min sont généralement utilisés dans une colonne avec un diam. int. 4,6 mm et environ 0,2 ml/min dans une colonne avec un diam. int. 2,1 mm (même vélocité linéaire dans la colonne). Sur un système avec un volume de retard typique de 1000 µl utilisant une colonne de 2,1 mm, il y aurait un segment isocratique « masqué » initial de 5 min alors que sur un système avec un volume de retard de 600 µl, le retard serait de 3 min. Ces volumes de retard seraient trop élevés pour des analyses d'une durée d'une à deux minutes. Avec des emballages sub-2-microniques, le débit optimal (d'après la courbe de Van Deemter) est légèrement supérieur, et une chromatographie rapide peut donc utiliser trois à cinq fois ces débits, entraînant ainsi des volu-

mes de retard d'environ une minute. Toutefois, le volume de retard doit ensuite être réduit pour parvenir à des retards d'une fraction de la durée d'analyse prévue. Ceci est possible avec le Binary LC Agilent 1260 Infinity grâce au faible volume de retard du circuit de la pompe et au faible volume du circuit à travers l'échantillonneur automatique.

Volume extra-colonne

Le volume extra-colonne est une source de dispersion de pic qui réduira la résolution de la séparation, il doit donc être réduit au maximum. Les colonnes d'un plus petit diamètre nécessitent des volumes extra-colonne proportionnellement plus petits afin de conserver la dispersion du pic à un minimum.

Dans un chromatographe en phase liquide, le volume extra-colonne dépendra des tuyaux de raccordement entre l'échantillonneur, la colonne et le détecteur, ainsi que du volume de la cuve à circulation dans le détecteur. Le volume extra-colonne est réduit au maximum avec le Binary LC Agilent Infinity série 1260 grâce au tuyau de faible diamètre (0,12 mm de diamètre interne), aux échangeurs de chaleur à faible volume dans le compartiment de colonne et à la cuve de type cartouche Max-Light dans le détecteur.

Volumes de retard dans le Binary LC Agilent 1260 Infinity

Les Tableau 4, page 42 et Tableau 5, page 42 montrent les volumes de composants qui contribuent au volume de retard dans le système CPL binaire Agilent 1260 Infinity .

Tableau 4 Volumes de retard des modules Binary LC 1260 Infinity

Composants	Volume de retard (µl)
Pompe binaire[1]	120
Pompe binaire[2]	600 – 800
Mélangeur à faible volume	200
Mélangeur	400
Échantillonneur automatique	270
Échangeur de chaleur à faible dispersion	1,6
Échangeur de chaleur intégré	3 et 6

1 en configuration de faible volume de retard avec un amortisseur et un mélangeur contournés

2 en configuration volume de retard standard

Tableau 5 Volumes de retard des configurations du Binary LC 1260 Infinity

Configuration du système	Volume de retard (µl)
Configuration du volume de retard faible	Pompe : 120 Échantillonneur automatique :
Configuration du volume de retard moyen	Pompe : 320
Configuration volume de retard standard	Pompe : 600 – 800

La commutation entre les configurations est possible de deux manières :

- manuellement, en déconnectant et en reconnectant les capillaires
- automatiquement, avec une vanne 2PS/6PT 600 bar (en option)

Configuration optimale de l'instrument pour les colonnes de d.i. 2,1 mm

Configuration à faible volume de retard pour le délai de gradient le plus court pour les séparations ultra rapides du gradient

Dans la configuration à faible volume de retard de la pompe binaire Agilent 1260 , l'amortisseur et le mélangeur sont contournés pour réduire le volume de retard de la pompe à environ 120 µL. Figure 13, page 43montre les raccordements du circuit pour cette configuration. Ceci fournit le retard de gradient le plus court pour des séparations ultra rapides du gradient. Afin de profiter pleinement de la commande d'amortissement électronique qui remplace l'amortissement de volume physique, il est important de sélectionner la fonction de **Enhanced Solvent Compressibility** sur l'écran auxiliaire du menu de la pompe.

Pour minimiser la dispersion du pic, le kit à dispersion faible (Kit à dispersion ultra-faible (G1316-68744)) doit être installé. Ce kit comporte des capillaires courts avec un diamètre interne de 0,12 mm et des échangeurs de chaleur à dispersion faible (1,6 µL et 1,5 µL) pour le compartiment à colonne thermostaté. Pour maintenir la résolution dans le détecteur UV, il faut utiliser une cuve à circulation de faible volume. Voir « Choix d'une cuve à circulation », page 65 pour les recommandations relatives à la cuve à circulation).

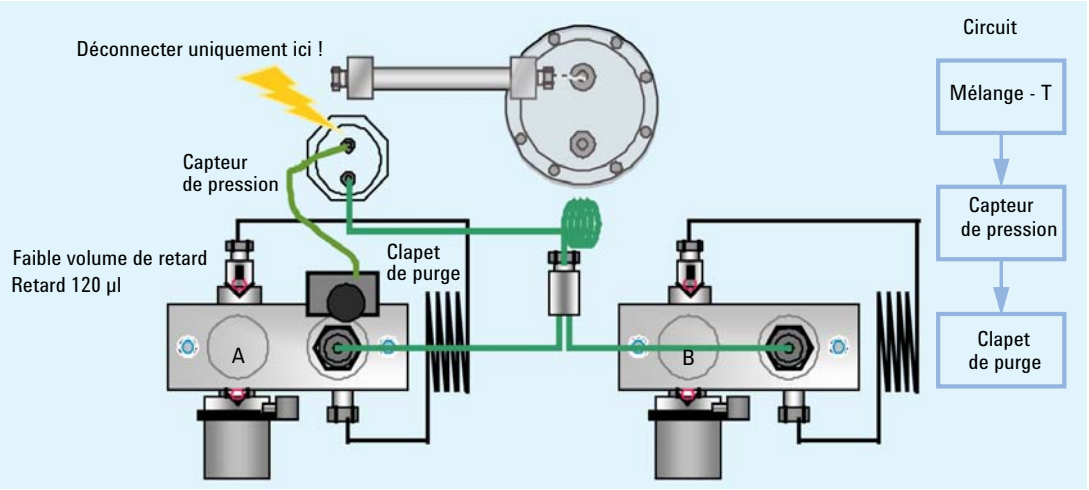


Figure 13 Configuration à faible retard pour les colonnes à diamètre interne de 2,1 mm

Il est important de régler le paramètre correct sur l'écran auxiliaire de la pompe. Ceci garantit que les bonnes valeurs de compressibilité sont toujours appliquées pour les phases mobiles utilisées. Des courbes d'étalonnage sont disponibles pour la majorité des solvants couramment employés.

Configuration de volume de retard moyen pour obtenir la sensibilité UV la plus élevée

Pour les applications UV haute sensibilité, un mélangeur 200 µL supplémentaire (Mélangeur à faible volume (200 µL) (5067-1565)) peut être installé pour réduire tout bruit de mélange résiduel. Ce petit mélangeur donne le bruit de base UV le plus faible, même dans des conditions de gradient extrêmes. Voir Figure 14, page 44.

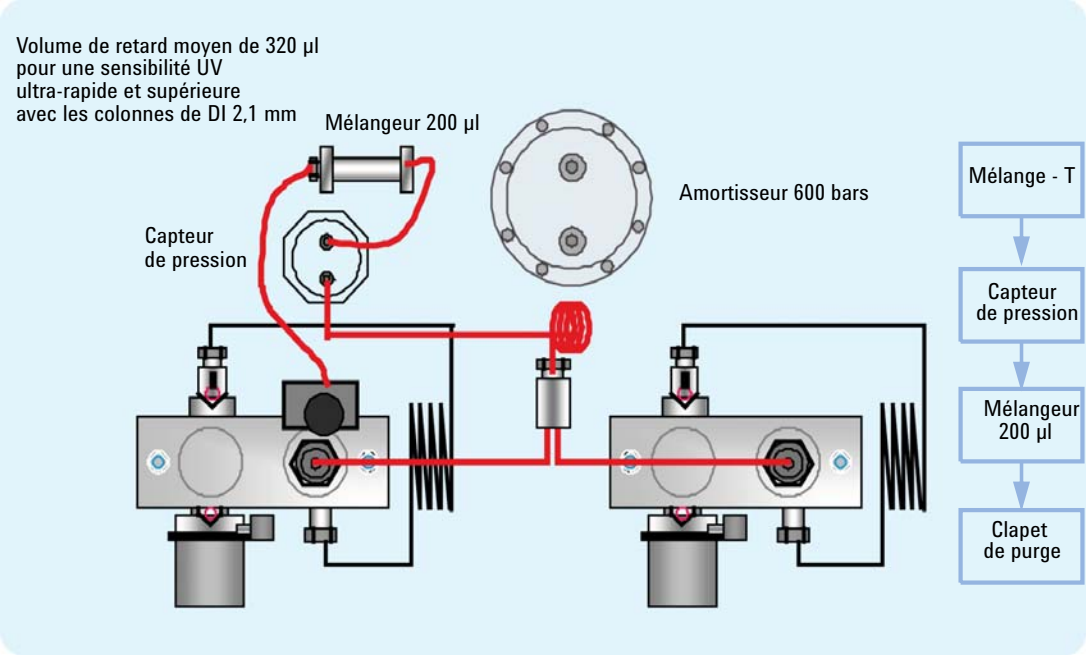


Figure 14 Configuration de volume de retard moyen pour colonnes à d.i. de 2,1 mm avec sensibilité UV la plus élevée

Configuration optimale de l'instrument pour les colonnes de d.i. 3 et 4,6 mm

Configuration de volume de retard standard pour la sensibilité UV la plus élevée et une transférabilité de méthode directe

Les volumes de colonnes relatifs pour les colonnes d'un diamètre interne de 3 mm et 4,6 mm sont environ deux à cinq fois supérieurs respectivement que pour les colonnes de même longueur avec un diamètre interne de 2,1 mm et les débits utilisés sont également proportionnellement plus élevés. C'est pourquoi le volume de retard standard de la pompe binaire n'entraînera pas de retard de gradient beaucoup plus élevé.

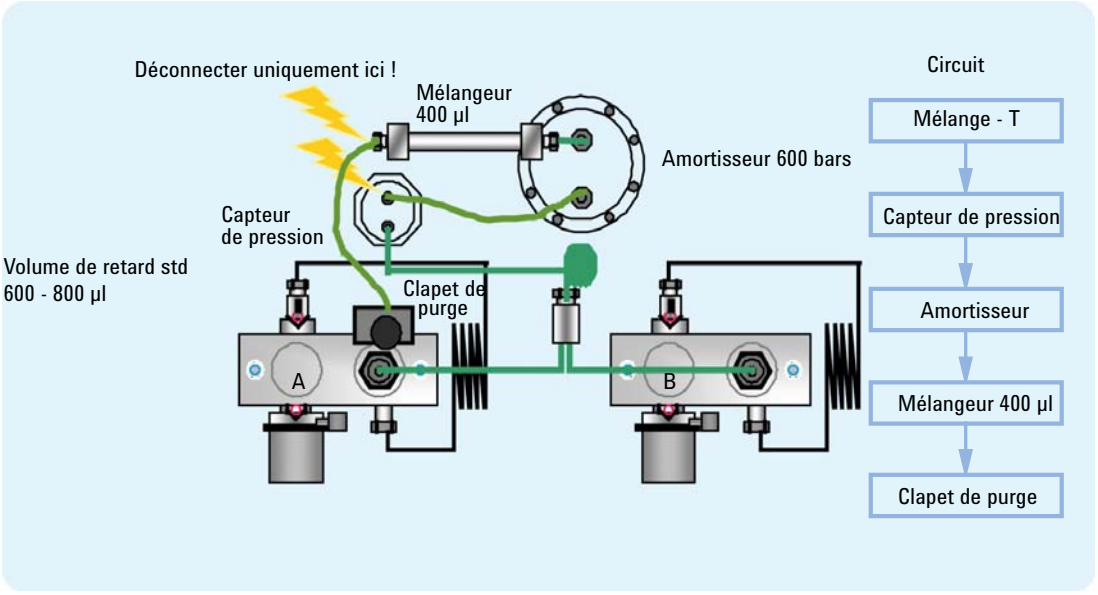


Figure 15 Configuration de volume de retard standard pour colonnes à d.i. de 3 et 4,6 mm avec sensibilité UV la plus élevée

La configuration de volume de retard standard est également la configuration qui fournit une transférabilité de méthode directe du système CPL Agilent série 1100 et 1200 au Binary LC 1260 Infinity ou inversement. La figure Figure 16, page 46 montre deux chromatogrammes superposés d'une méthode d'analyse du paracétamol et des impuretés associées. La méthode a été transférée d'un système LC Agilent série 1200 à un Binary LC Agilent 1260 Infinity avec des conditions chromatographiques (colonne, phase mobile, paramètres de pompe, volume d'injection, température de colonne, paramètres du détecteur) inchangées. Comme on le voit, un transfert de méthode fluide est possible.

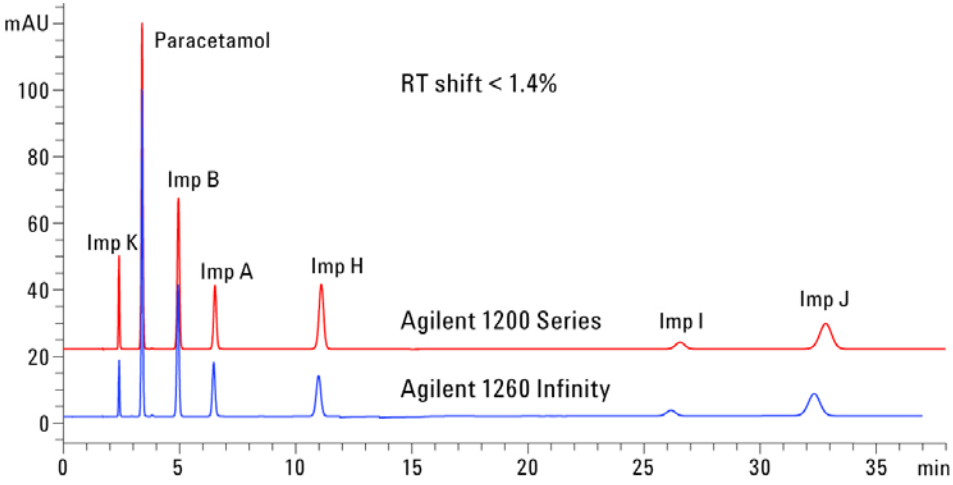


Figure 16 Comparaison du système CPL Agilent 1260 Infinity et Agilent série 1200 dans une configuration

Comment augmenter le volume d'injection

La configuration standard de l'échantillonneur automatique Agilent 1260 Infinity peut injecter un volume maximum de 100 µL avec le capillaire boucle standard. Pour augmenter le volume d'injection, le Mise à niveau pour multi-prélèvement (G1313-68711)peut être installé. Avec le kit, vous pouvez ajouter un maximum de 400 µL ou de 1400 µL au volume d'injection de votre injecteur. Le volume total est alors de 500 µL ou de 1500 µL pour l'échantillonneur automatique 1260 Infinity avec la tête analytique 100 µL. Notez que le volume de retard de votre échantillonneur automatique est prolongé lorsque vous utilisez les capillaires de siège étendus du kit de multi-prélèvement. Lorsque vous calculez le volume de retard de l'échantillonneur automatique, vous devez doubler le volume des capillaires prolongés. Le volume de retard du système dû à l'échantillonneur automatique augmentera en proportion.

Dès qu'une méthode est réduite depuis une colonne plus haute vers une colonne plus petite, il est important que la translation de méthode autorise une réduction du volume d'injection proportionnellement au volume de la colonne afin de conserver la performance de la méthode. Ceci pour conserver le volume d'injection au même pourcentage de volume par rapport à la colonne. Ceci est particulièrement important si le solvant d'injection est plus fort (plus éluotrope) que la phase mobile de démarrage et toute augmentation affectera la séparation, en particulier pour les pics des premières analyses (faible facteur de rétention). Dans certains cas, c'est la cause de distorsion du pic et la règle générale consiste à conserver le solvant d'injection similaire ou plus faible que la composition du gradient de démarrage. Ceci a une conséquence pour savoir si, ou de combien, on peut augmenter le volume d'injection et l'utilisateur devra contrôler la présence de signes d'augmentation de la dispersion (des pics plus larges ou plus déformés et une réduction de la résolution du pic) en essayant d'augmenter le volume d'injection. Si une injection est réalisée dans un solvant faible, on pourra alors probablement augmenter le volume parce que l'effet sera de concentrer l'analyte au sommet de la colonne au démarrage du gradient. Inversement, si l'injection est réalisée dans un solvant plus fort que celui de la phase mobile de démarrage, l'augmentation du volume d'injection s'étendra alors sur la bande de l'analyte dans le bas de la colonne et à l'écart du gradient, résultant en une dispersion du pic et une perte de résolution.

Le principal élément à prendre en compte pour la détermination du volume d'injection est peut-être le diamètre de la colonne, car cela exercera un impact important sur la dispersion du pic. La hauteur du pic peut être plus élevée sur une colonne étroite qu'avec une plus grande injection sur une colonne plus large parce qu'il y a moins de dispersion du pic. Avec des colonnes d'un diamètre interne de 2,1 mm, les volumes d'injection typiques peuvent aller jusqu'à 5 à 10 µl, mais cela dépendra fortement de la chimie de l'analyte et de la phase mobile comme discuté ci-dessus. Dans une séparation de gradient, des volumes d'injection d'environ 5 % du volume de la colonne pourraient être atteints tout en conservant une bonne résolution et une bonne dispersion du pic.

Comment obtenir des durées de cycle plus courtes

Des durées de cycle plus courtes peuvent être obtenues en choisissant une colonne courte avec une bonne sélectivité. Les dimensions de la colonne sont également déterminées par le système de détection utilisé. Pour la détection UV, les colonnes d'un diamètre interne de 3,0 mm sont idéales, car elles atteignent les vitesses linéaires les plus élevées possibles. Avec les colonnes d'un diamètre interne de 4,6 mm, il est également possible d'atteindre des vitesses linéaires élevées, mais le débit maximum est limité à 5 mL/min.

La pompe doit être utilisée dans sa configuration de volume de retard standard (voir Figure 13, page 43) pour les colonnes d'un diamètre interne de 4,6 mm et de 3,0 mm. Pour les colonnes d'un diamètre interne de 2,1 mm, la configuration de volume de retard faible doit être utilisée. De plus, avec des colonnes d'un diamètre interne de 2,1 mm, le kit à dispersion faible doit être installé afin de fournir le plus faible volume extra-colonne. Pour la sensibilité UV la plus élevée, il est également recommandé d'utiliser le mélangeur court (Mélangeur à faible volume (200 µL) (5067-1565)).

Les conditions chromatographiques dépendent fortement des composés à analyser, mais certaines règles empiriques peuvent être utilisées pour des durées d'analyse courtes :

- Les débits doivent être aussi élevés que possible, en fonction de la résolution requise, de la contrepression et du système de détection utilisé.
- De forts gradients doivent être utilisés.
- Des températures de colonne élevées sont recommandées afin de pouvoir utiliser des débits élevés et de réduire encore davantage le temps d'analyse. Les colonnes Zorbax SB peuvent être utilisées jusqu'à 90 °C, à un pH faible.

Alterner la régénération des colonnes

Des durées de cycle encore plus courtes sont possibles en utilisant une vanne de régénération des colonnes avec une pompe de régénération. Avec cette configuration, la régénération de la colonne utilisée précédemment a lieu pendant l'analyse de la deuxième colonne. Ceci réduit considérablement la durée du cycle.

L'utilisation de deux colonnes, deux pompes et une vanne 2 positions/10 voies permet de commuter entre ces colonnes pour les durées de cycle les plus courtes d'une injection à l'autre. Généralement, les colonnes de chimie et de lot identiques fournissent une précision du temps de rétention qui permet de traiter les données avec le même tableau d'étalonnage.

Veuillez consulter le mode d'emploi des solutions de vanne pour une description plus détaillée de l'alternance de la régénération des colonnes.

Réduction automatique du volume de retard (ADVR)

L'échantillonneur automatique haute performance Agilent 1260 Infinity permet de réaliser des injections chevauchantes (OI) et/ou une réduction automatique du volume de retard (ADVR). Cela signifie que le clapet d'injection est commuté hors du circuit quand l'échantillon a atteint le sommet de la colonne. Ceci réduit considérablement le volume de retard, voir Figure 17, page 50.

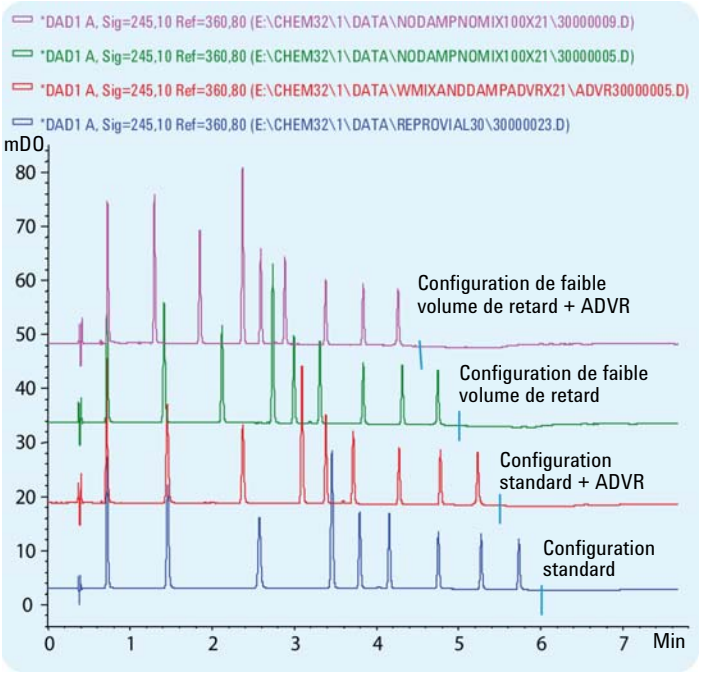


Figure 17 Réduction du volume de retard

Plus le débit est faible, plus important est l'impact négatif que l'on peut attendre du volume de retard. Dans Figure 17, page 50, une colonne d'un diamètre interne de 2,1 mm a été utilisée à un débit de 0,6 mL/min. Le volume de retard est réduit palier par palier de la trace la plus basse à la trace supérieure. L'influence sur la durée d'analyse totale ainsi que l'impact, en particulier sur la largeur de pic et les hauteurs des premiers pics, sont évidents.

L'inconvénient de l'injection chevauchante et de la réduction automatique du volume de retard est que l'échantillonneur automatique n'est pas dans le circuit pendant toute la durée d'analyse. Pour les composés très collants, cela peut provoquer un transfert supérieur et/ou une discrimination des composés.

Le transfert est le pourcentage de composé qui reste dans les parties de l'instrument en contact avec l'échantillon et qui n'est pas rincé dans la colonne pour l'analyse. Cela signifie aussi que ce pourcentage est perdu pour la mesure quantitative ; il est discriminé. Le transfert peut être mesuré en injectant du solvant pur après l'analyse de l'échantillon. La discrimination et le transfert peuvent devenir encore plus importants si les composés de l'analyte sont apolaires et que le démarrage du gradient contient un pourcentage d'eau élevé. Dans le pire des cas, le composé apolaire précipite à la surface de contact. De petits bouchons, par exemple de diméthylsulfoxyde avant et après le bouchon d'échantillon, peuvent aider à minimiser ce problème.

Pour l'injection chevauchante ou la réduction automatique du volume de retard, le temps avant la commutation du clapet d'injection en mode dérivation doit être augmenté avec le facteur de rinçage à 20. Ceci prolonge le temps pendant lequel le volume de retard de l'échantillonneur automatique est rincé avec la phase mobile.

Comment améliorer la capacité d'analyse

L'injection peut être optimisée pour la vitesse, en n'oubliant pas qu'une aspiration trop rapide du solvant peut réduire la reproductibilité. On peut faire ici des gains marginaux, car les volumes d'échantillon utilisés tendent de toutes façons à se diriger vers la plus petite extrémité de la plage. Une partie significative du temps d'injection est le temps pris par les mouvements de l'aiguille vers et depuis le flacon et vers le port de rinçage. Ces manipulations peuvent être exécutées pendant l'analyse de la séparation précédente. C'est ce que l'on appelle le « chevauchement d'injections » qui peut être facilement activé depuis l'écran des réglages de l'échantillonneur automatique dans le logiciel de commande. On peut ordonner à l'échantillonneur automatique de diriger le circuit vers l'échantillonneur automatique à dévier après que l'injection ait été effectuée, puis après, par exemple, 3 minutes dans une analyse de 4 minutes, de démarrer le processus d'aspiration de l'échantillon suivant et de préparation pour l'injection. Ceci peut généralement permettre de gagner de 0,5 à 1 minute par injection.

Comment obtenir le transfert le plus bas

Le transfert est mesuré quand des pics résiduels d'une injection active précédente apparaissent dans une injection de solvant blanc consécutive. Il y a des transferts entre les injections actives pouvant donner des résultats erronés. Le niveau de transfert est indiqué comme la zone du pic dans la solution blanche exprimée comme un pourcentage de la zone dans l'injection active précédente. L'échantillonneur automatique Agilent 1260 Infinity est optimisé pour le transfert le plus bas à travers une conception minutieuse du circuit et l'utilisation de matériaux dans lesquels l'absorption d'échantillon est minimisée. Un chiffre de transfert de 0,002 % doit pouvoir être obtenu même quand un spectromètre de masse à triple quadripôle est le détecteur. Les paramètres de fonctionnement de l'échantillonneur automatique permettent à l'utilisateur de définir des paramètres appropriés pour minimiser le transfert dans toute application impliquant des composés susceptibles de rester coincés dans le système.

Les fonctions suivantes de l'échantillonneur automatique peuvent être utilisées pour minimiser le transfert :

- Lavage d'aiguille interne
- Lavage d'aiguille externe
- Rétrobalayage du siège d'aiguille
- Nettoyage de la vanne d'injection

Le circuit, y compris l'intérieur de l'aiguille, est rincé en continu en fonctionnement normal, fournissant une bonne élimination du transfert dans la plupart des situations. La réduction automatique du volume de retard (ADVR) réduit le volume de retard mais également le rinçage de l'échantillonneur automatique et ne doit pas être utilisée avec des analytes si le transfert peut être un problème.

Pour assurer le transfert le plus bas, prenez note des recommandations suivantes :

- Utilisez toujours l'échantillonneur automatique avec le clapet d'injection en position de voie principale.
- Rincez l'extérieur de l'aiguille avec un solvant approprié à l'aide du port de rinçage. Le temps de rinçage doit être d'au moins 10 s.

- Si possible, réduisez la vitesse de prélèvement à 10 µL/min.
- Utilisez des flacons de 2 mL avec capuchons Agilent (Flacon avec bouchon à vis, 2 mL (5182-0556)).
- Si le siège est contaminé, utilisez une procédure de rinçage du siège appropriée.
- Utilisez des solvants de rinçage pouvant dissoudre les composés de l'échantillon.
- Utilisez des phases mobiles acides pour les composés basiques.

Rinçage et nettoyage de l'échantillonneur automatique pour obtenir un transfert proche de zéro

Au cours de la procédure d'injection, la boucle d'échantillon, l'intérieur de l'aiguille, le capillaire du siège et la voie principale du clapet d'injection sont dans le circuit et y restent tout au long de l'analyse. Cela signifie que ces pièces sont rincées en continu par la phase mobile tout au long de l'analyse. Ce n'est que lors de l'aspiration de l'échantillon que le clapet d'injection est commuté hors du circuit. Dans cette position, l'effluent de la pompe est dirigé directement vers la colonne. Avant l'injection, les surfaces extérieures de l'aiguille sont lavées avec du solvant frais à l'aide du port de rinçage de l'échantillonneur automatique, ce qui évite la contamination du siège de l'aiguille. Le port de rinçage de l'échantillonneur automatique est rempli de solvant frais par une pompe péristaltique installée dans le boîtier de l'échantillonneur automatique. Le port de rinçage a un volume d'environ 680 µL et la pompe fournit 6 mL/min. Le réglage du temps de rinçage sur 10 s signifie que le volume du port de rinçage est rempli plusieurs fois de solvant frais, ce qui suffit dans la plupart des cas pour nettoyer l'extérieur de l'aiguille.

Comment améliorer la résolution

Une résolution accrue dans une séparation améliore le traitement de données qualitatives et quantitatives, permet de séparer plus de pics ou offre une meilleur portée pour accélérer la séparation. Cette section indique comment augmenter la résolution en examinant les points suivants :

- Optimiser la sélectivité
- Plus petit emballage de taille des particules
- Colonnes plus longues
- Gradients plus faibles, flux plus rapide
- Volume extra-colonne minimal
- Optimisation du solvant et du volume d'injection
- Collecte de données assez rapide

La résolution entre deux pics est décrite par l'équation de résolution :

$$Rs = \frac{1}{4}\sqrt{N}\,\frac{(\alpha - 1)}{\alpha}\,\frac{(k_2 + 1)}{k_2}$$

où

- R_s=résolution,
- N=nombre de plaques (mesure d'efficacité de la colonne),
- α=sélectivité (entre deux pics),
- k_2=facteur de rétention du second pic (anciennement nommé facteur de capacité).

Le terme qui a l'effet le plus important sur la résolution est la sélectivité, α, et en pratique le fait de varier ce terme implique de changer le type de phase stationnaire (C18, C8, phényle, nitrile etc.), la phase mobile et la température pour maximiser les différences de sélectivité entre les solutés à séparer. Ceci est un travail long qu'il est préférable d'effectuer avec un système de développement de méthode automatique permettant d'évaluer une large gamme de conditions sur différentes colonnes et phases mobiles dans un protocole de recherche ordonné. Cette section indique comment obtenir une meilleure résolution avec toutes les phases stationnaires et mobiles choisies. Si un système

de développement de méthode automatique a été utilisé pour déterminer les phases, il est probable que des colonnes courtes aient été utilisées pour une analyse rapide de chaque étape de la recherche.

L'équation de résolution montre que le prochain terme le plus important est le nombre de plaques ou l'efficacité, N, et ceci peut être optimisé de nombreuses manières. N est inversement proportionnel à la taille de particule et directement proportionnel à la longueur d'une colonne ; ainsi, une taille de particule plus petite et une colonne plus longue donneront un numéro de plaque plus élevé. La pression augmente à l'inverse du carré de la taille de particule et proportionnellement à la longueur de la colonne. La résolution augmente avec la racine carrée de N, ainsi le fait de doubler la longueur de la colonne augmente la résolution d'un facteur de 1,4 . Ce qui est possible dépend de la viscosité de la phase mobile, car ceci est lié directement à la pression. Les mélanges de méthanol génèrent plus de contrepression que les mélanges d'acétonitrile. L'acétonitrile est souvent préféré car les formes de pic sont meilleures et plus étroites en plus de la viscosité plus faible, mais le méthanol donne généralement une meilleure sélectivité (certainement pour les petites molécules de moins de 500 Da environ). La viscosité peut être réduite en augmentant la température, mais il ne faut pas oublier que ceci peut modifier la sélectivité de la séparation. Des expériences montreront si ceci augmente ou diminue la sélectivité. Quand le débit et la pression augmentent, il faut noter que le chauffage par friction augmente à l'intérieur de la colonne. Ceci peut entraîner une dispersion légèrement accrue et éventuellement un petit changement de sélectivité, les deux étant visibles comme une baisse de résolution. Ce dernier cas peut être retardé en réduisant la température du thermostat de quelques degrés et encore une fois, des expériences donneront la réponse.

La courbe van Deemter montre que le débit optimal à travers une colonne STM est supérieur que pour les particules plus grandes et assez plate quand le débit augmente. Généralement, près de la valeur optimale, les débits des colonnes STM sont : 2 ml/min pour un diamètre intérieur de 4,6 mm et 0,4 ml/min pour un diamètre intérieur de 2,1 mm.

Dans les séparations isocratiques, l'augmentation du facteur de rétention k donne une meilleure résolution car le soluté est conservé plus longtemps.

Dans les séparations du gradient, la rétention est décrite par k^* dans l'équation suivante :

$$k^* = \frac{t_G}{\Delta\%B} \cdot \frac{F}{V_m} \cdot \frac{100}{S}$$

où :

- k^* = valeur k moyenne,
- t_G = longueur de temps du gradient (ou segment du gradient) (min),
- F = débit (mL/min),
- V_m = volume de retard de colonne,
- Δ%B = changement de fraction du solvant B pendant le gradient,
- S = constant (env. 4-5 pour les petites molécules).

Ceci montre que k et donc la résolution peuvent être augmentés à l'aide d'un gradient plus faible (un changement de 2 à 5 %/min est une ligne directrice), un débit plus élevé et une colonne de plus petit volume. Cette équation montre aussi comment accélérer un gradient existant : si le flux est doublé mais le temps de gradient est divisé par deux, k^* reste constant et la séparation a l'air semblable mais se produit dans la moitié du temps.

Toute diminution du volume extra-colonne réduit la dispersion et donne une meilleure résolution. Ceci est déjà optimisé dans le Binary LC 1260 Infinity avec des capillaires de petit diamètre (d.i. 0,12 mm) (vérifiez que la longueur la plus courte est utilisée entre la colonne et le détecteur) et la cuve à circulation de la cartouche Max-Light.

Enfin, tout gain de résolution doit être préservé avec une collecte de données assez rapide pour déterminer avec précision les pics étroits.

En résumé, les étapes suivantes doivent être prises en compte pour augmenter la résolution :

- La première étape pour améliorer la résolution est toujours de tester différentes phases stationnaires et de sélectionner la colonne ayant la meilleure séparation. C'est le paramètre le plus important pour la résolution.
- La deuxième étape est d'utiliser des colonnes longues ou même des colonnes couplées pour augmenter le nombre de plateaux.
- Une troisième étape est de décaler les pics pour des facteurs de rétention plus élevés. Pour les valeurs k de 5 à 10, l'impact est important. Avec des valeurs k supérieures, l'effet est très faible.

En pratique, cela signifie que des colonnes plus longues avec une sélectivité appropriée donnent une meilleure résolution.

Configuration optimale de l'instrument pour une haute résolution

Compartiment à colonnes

Le compartiment à colonnes peut être utilisé dans sa version standard pour les colonnes d'un diamètre interne de 4,6 mm. À des débits supérieurs à 2 mL/min et des températures supérieures à 60 °C, l'effluent de la colonne doit être refroidi à la température du détecteur à l'aide du refroidisseur/chauffage 1,5 µL dans le compartiment à colonnes. Ceci garantit le niveau de bruit le plus bas avec les détecteurs UV, même à 5 mL/min et 80 °C (voir Figure 18, page 58).

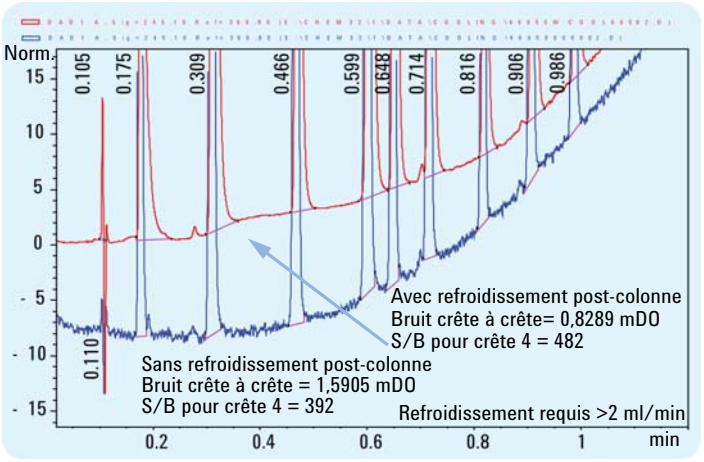


Figure 18 Influence du refroidissement post-colonne (PCC) sur le bruit de ligne de base

Si des colonnes d'un diamètre intérieur de 2,1 mm sont utilisées à des débits faibles, le petit chauffage doit être utilisé pour le plus faible volume extra-colonne.

Volume extra-colonne

Pour maintenir la haute résolution obtenue sur la colonne, le volume extra-colonne, en particulier après la colonne, doit être aussi faible que possible.

- Pour les colonnes d'un diamètre interne de 4,6 mm, la configuration de retard standard doit être utilisée pour la pompe, voir Figure 15, page 45.
- Pour les colonnes d'un diamètre interne 2,1 mm, la configuration à faible retard doit être utilisée pour la pompe et le kit à dispersion faible doit être installé dans le compartiment à colonnes. Pour la sensibilité UV la plus élevée, le mélangeur court est également recommandé. Voir la Figure 13, page 43 et la Figure 14, page 44.
- Le volume d'injection est également important, en particulier si l'échantillon est dissout dans un solvant organique. Dans ce cas, le gradient doit démarrer avec un faible pourcentage de phase organique afin de concentrer les composés au sommet de la colonne. Ceci évite la dispersion du pic due à l'injection.
- La cuve de type cartouche Max-Light de 10 mm présente un faible volume de dispersion (volume σ de 1,0 µL) et aucune optimisation de volume supplémentaire n'est nécessaire.
- Pour des applications où la cuve Max-Light haute sensibilité de 60 mm est utilisée pour obtenir une sensibilité plus élevée, le volume de la cuve est optimisé pour une utilisation avec des colonnes de diamètre interne de 3 mm et 4,6 mm.

Fréquence d'acquisition

Le paramètre de fréquence d'acquisition pour le détecteur UV doit être correctement sélectionné. Le choix d'une fréquence d'acquisition trop faible entraîne une largeur de pic accrue et une résolution plus basse, voir Figure 19, page 60.

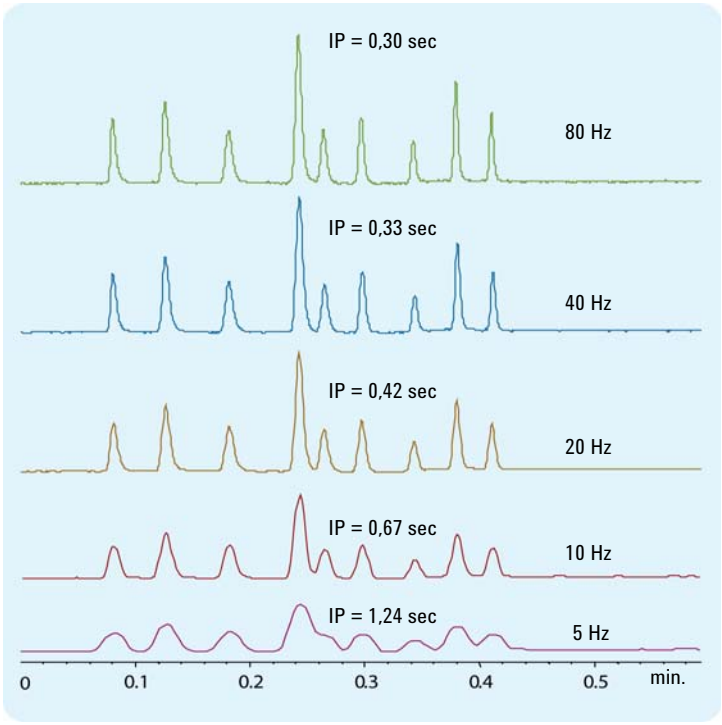


Figure 19 Largeur de pic par rapport à la fréquence d'acquisition UV

Tableau 6, page 61 montre que la largeur de pic, la résolution et la capacité de pic dépendent de la fréquence d'acquisition. Des fréquences d'acquisition élevées sont nécessaires pour le CPL rapide et ultra rapide ; sinon, la séparation obtenue sur la colonne est détruite dans le détecteur.

Tableau 6 Rapport entre la fréquence d'acquisition et la performance chromatographique

Fréquence d'acquisition	Largeur de pic	Résolution	Capacité de pic
80 Hz	0,300	2,25	60
40 Hz	0,329	2,05	55
20 Hz	0,416	1,71	45
10 Hz	0,666	1,17	29
5 Hz	1,236	0,67	16

80 Hz de fréquence d'acquisition par rapport à 20 Hz de fréquence d'acquisition entraîne des améliorations dans :

- Largeur de pic :

  – 30 %
- Résolution :

  + 30 %
- Capacité de pic :

  + 40 %
- Efficacité de colonne apparente :

  + 70 %

Conditions chromatographiques

Comme déjà indiqué, les conditions chromatographiques dépendent des composés à analyser. Mais ici aussi, il existe des règles empiriques.

- Des débits modérés doivent être utilisés, mais des expériences récentes ont montré que des débits élevés peuvent aussi être avantageux pour une meilleure séparation. Pour les colonnes d'un diamètre interne de 4,6 mm contenant des particules sub-2-microniques, un débit de 2 mL/min est recommandé comme valeur de départ. Pour les colonnes sub-2-microniques d'un diamètre interne de 2,1 mm, 0,4 mL/min est un bon point de départ.
- Des gradients modérés doivent être utilisés, par exemple une modification du gradient de 2 – 5 % par minute.
- La température de la colonne est un paramètre supplémentaire pour l'optimisation. La température peut influencer une séparation et ne doit pas être négligée.

Comment améliorer la sensibilité

La sensibilité d'une méthode de séparation est liée au choix des phases stationnaires et mobiles car une bonne séparation avec des pics étroits et une base stable avec un bruit minimum sont souhaitables. Le choix de configuration de l'instrument a un effet et la configuration du détecteur a un impact majeur.

Configuration optimale de l'instrument pour une sensibilité élevée

Aspects généraux

- Pour obtenir le bruit de ligne de base le plus faible, la configuration du volume de retard standard est recommandée pour la pompe binaire 1260 Infinity .
- Ici aussi, le volume d'injection et le solvant de dissolution de l'échantillon sont importants. Il faut s’assurer que les composés soient concentrés dans le haut de la colonne, afin d’éviter une dispersion du pic due à l’injection, ce qui pourrait réduire la hauteur du pic. Pour ce faire, l’échantillon doit être dissous dans une composition de solvant d’une force d’élution plus faible que la phase mobile.
- La température de la colonne ne doit pas être trop basse afin d'éviter une longue rétention des pics sur la colonne. Ceci crée également une dispersion du pic et une hauteur de pic plus faible.
- La fréquence d'acquisition du détecteur UV doit être sélectionnée en fonction de la largeur de pic réel. Les fréquences d'acquisition plus élevées que nécessaire doivent être évitées en raison des niveaux de bruit plus élevés.
- Les détecteurs UV disponibles sont le détecteur à barrette de diodes Agilent 1260 Infinity (G4212B) et le détecteur à longueur d'onde variable Agilent 1260 Infinity (G1314F), avec des fréquences d'acquisition de 80 Hz ainsi que des niveaux de bruit et de dérive beaucoup plus bas.
- « Choix d’une cuve à circulation », page 65 donne un aperçu des cuves à circulation disponibles avec le G4212B DAD . Pour des informations sur les cuves à circulation utilisées avec le G1314F VWD , veuillez consulter le mode d'emploi du détecteur à longueur d'onde variable Agilent 1260 Infinity .

Conditions chromatographiques

Pour un rapport signal/bruit optimal, il est préférable que les pics s'éluent rapidement.

- Des débits élevés doivent être utilisés pour éluer les pics à des valeurs k basses.
- Des gradients plus rapides peuvent aussi être appliqués pour éluer les pics à des valeurs k basses.

Colonnes

La sensibilité est spécifiée comme un rapport signal/bruit (S/B) et donc le besoin de maximiser la hauteur de pic et de minimiser le bruit de base. Toute réduction de la dispersion du pic aide à maintenir la hauteur de pic, le volume extra-colonne doit donc être minimisé par l'utilisation d'un diamètre interne court et étroit, des capillaires de raccordement et des raccords correctement installés. L'utilisation de colonnes de diamètre intérieur plus petit peut entraîner une hauteur de pic supérieure et est donc idéale pour les applications avec des quantités d'échantillons limitées. Si la même quantité d'échantillon peut être injectée dans une colonne avec un diamètre intérieur plus petit, la dilution due au diamètre de la colonne est inférieure et la sensibilité augmente. Par exemple, l'augmentation du diamètre intérieur de la colonne de 4,6 mm à 2,1 mm provoque un gain théorique de la hauteur de pic de 4,7 times en raison de la baisse de dilution dans la colonne. Pour un détecteur de spectromètre de masse, les débits inférieurs des colonnes étroites peuvent donner de meilleures efficacités d'ionisation et donc une sensibilité plus élevées.

Paramètres du détecteur

Le détecteur est doté d'un certain nombre de paramètres que l'on peut utiliser pour optimiser ses performances. Les sections suivantes décrivent la manière dont les paramètres du détecteur affectent les caractéristiques de performance :

- La cuve à circulation affecte la sensibilité ;
- La longueur d'onde et la bande passante affectent la sensibilité, la sélectivité et la linéarité ;
- La largeur de fente affecte la sensibilité, la résolution spectrale et la linéarité ;
- La largeur de pic affecte la sensibilité et la résolution.

Choix d'une cuve à circulation

Différentes versions de la cuve à circulation de type cartouche Max-Light sont disponibles, voir (Tableau 7, page 65).

Tableau 7 Caractéristiques des cuves à circulation de type cartouche Max-Light

Cuves de type cartouche	• Cuve de type cartouche Max-Light (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008) • Cuve de type cartouche Max-Light Bio-inert (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G5615-60018) • Cuve de type cartouche Max-Light (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007) • Cuve de type cartouche Max-Light Bio-inert (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G5615-60017) • Cuve à plage dynamique élevée de type cartouche Max-Light (3,7 mm, V(s) 0,4 µL) (G4212-60032) • Cuve à dispersion ultra-faible de type cartouche Max-Light (10 mm, V(s) 0,6 µL) (G4212-60038) • Cuve de test de type cartouche Max-Light (G4212-60011)
Pression maximum	70 bar (1015 psi) de pression de fonctionnement maximale (MOP)[1] 150 bar (2175 psi) de pression d'incident maximale (MIP)[2]
gamme de pH	1,0-12,5 (en fonction du solvant)

[1] Pression de fonctionnement maximale (MOP) : la pression maximale à laquelle le système peut fonctionner en continu dans des conditions normales.

[2] Pression d'incident maximale (MIP) : la pression maximale que le système peut connaître pendant un bref moment.

Applications normales

Le Cuve de type cartouche Max-Light (10 mm, V(s) 1,0 µL) (G4212-60008) couvre une vaste gamme d'applications :

- tout le diamètre de la colonne réduit jusqu'à au moins 2,1 mm ID, ou même moins.
- les applications avec dispersion du pic (largeur du pic x débit) réduisent jusqu'à ~2 µL [exemple : lp = 0,04 min pour un débit égal à = 0,1 mL/min donne une dispersion de pic de 0,04 min x 0,1 mL/min = 0,004 mL = 4 µL]

Sensibilité élevée

Si vous souhaitez obtenir une meilleure sensibilité, vous pouvez utiliser la Cuve de type cartouche Max-Light (60 mm, V(s) 4,0 µL) (G4212-60007) . Cette cuve améliore le détecteur en abaissant la limite de détection (LOD) par un facteur d'environ 3 (en fonction de l'application).

Dispersion ultra-faible

La cuve à dispersion ultra-faible de type cartouche Max-Light peut être utilisée avec le DAD G4212A et le GDAD 4212B . Cette cuve est nécessaire à la solution du kit de dispersion ultra-faible qui existe actuellement comme Kit 1290 Infinity à dispersion ultra-faible (5067-5189). Elle doit faire partie de la solution de dispersion ultra-faible.

Plage dynamique élevée

La cuve de type cartouche Max-Light à plage dynamique élevée peut être utilisée avec le DAD G4212A et le GDAD 4212B . Cette cuve est nécessaire à la solution de plage dynamique élevée (HDR) qui sera lancée en mars-avril 2013.

REMARQUE Pour protéger la cuve à circulation contre la surpression (p. ex. dans les systèmes avec CPL/MS), installez Kit de soupapes de surpression en ligne (G4212-68001), voir le manuel *Détecteurs à barrette de diodes Agilent Infinity série 1200*.

Comment empêcher les obstructions de colonne

Les colonnes remplies de particules sub-2-microniques nécessitent en plus des frittés avec des pores de faible diamètre pour empêcher le matériau de remplissage d'être entraîné hors de la colonne. Cela accroît le risque d'obstruer ces frittés avec des particules contenues dans les échantillons et/ou la phase mobile et provenant de l'instrument lui-même. Pour protéger la colonne, de petits filtres supplémentaires (Figure 20, page 68) peuvent être utilisés devant la colonne. Il est également recommandé de filtrer et/ou centrifuger soigneusement l'échantillon et d'éviter tout type de particules dans les phases mobiles.

Respectez les recommandations d'utilisation simples suivantes afin d'optimiser vos résultats :

1. Installez et utilisez la colonne seulement dans le sens d'écoulement indiqué sur la colonne.
2. Utilisez uniquement des solvants d'un niveau de qualité élevée pour chromatographie.
3. Filtrez tous les tampons aqueux et tous les échantillons à l'aide d'un 0,2 µmfiltre approprié avant de les utiliser.
4. Remplacez les bouteilles de phase mobile tamponnée toutes les 24 – 48 h, n'ajoutez pas de phase mobile à la bouteille ; utilisez toujours une nouvelle bouteille.
5. N'utilisez pas de phase mobile tamponnée à forte concentration en sel (> 50 mM) avec des concentrations élevées d'acétonitrile en raison du risque de précipitation.
6. Un filtre en ligne pour piéger les particules et rallonger la durée de vie de la colonne. Utilisez le filtre en ligne 1260 Infinity adapté à votre colonne : Filtre en ligne CPL 1260, filtre à pores de 2,1 mm, 0,2 µm, max 600 bar, capillaire de raccordement 70 x 0,12 mm SS (5067-1551) pour les colonnes d'un d.i. de 2,1 , Filtre en ligne CPL 1260, filtre à pores de 4,6 mm, 0,2 µm, max 600 bar, capillaire de raccordement 90 x 0,17 mm SS (5067-1553) pour les colonnes d'un d.i. de 4,6 mm ou 3,0 mm. Changez le filtre quand la pression augmente de 10 %.
7. Purgez les pompes (et les raccords jusqu'à la colonne) de toute phase mobile tamponnée et faites passer 5 mL de solvant avant d'installer la colonne dans l'instrument.

8 Purgez la colonne avec une phase mobile compatible en commençant à un débit de 0,1 mL/min pour une colonne de diamètre interne de 2,1 mm, de 0,2 mL/min pour un diamètre interne de 3,0 mm et de 0,4 mL/min pour un diamètre interne de 4,6 mm. Augmentez le débit jusqu'atteindre le débit souhaité sur une période de 5 minutes.

9 Une fois que la pression s'est stabilisée, connectez la colonne au détecteur.

10 Équilibrez la colonne et le détecteur avec 10 volumes de colonne de phase mobile avant utilisation. (1 – 5 mL en fonction de la taille de la colonne.)

11 Évitez toute surpression. Contrôlez la plage de pression de votre gradient, qui peut être de 100 – 130 bar ou plus, avant de lancer toute analyse.

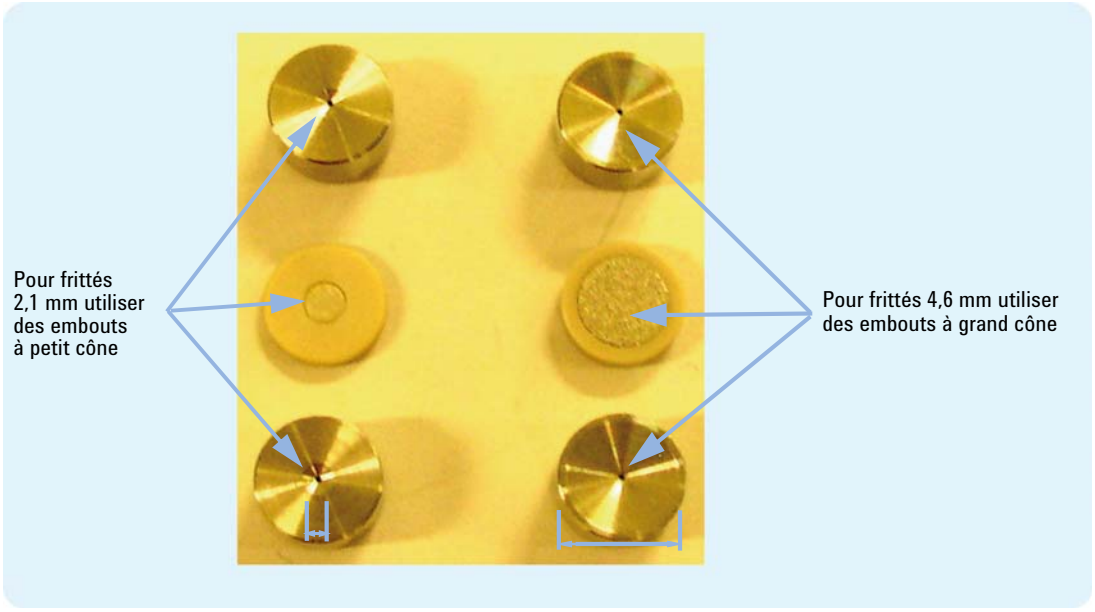


Figure 20 Protection pour colonnes d'un d.i. de 4,6 et 2,1 mm contenant des particules de 1,8 µm, fritté d'entrée avec une taille de pore de 0,2 µm

4
Configuration et installation du système

Installation du logiciel 70
Installation des modules 72
- Installation des modules du système 72
- Intégration au réseau 72
- Connexions des capillaires et tubes dans le circuit 73
- Amorçage du système 78

Ce chapitre décrit l'installation du logiciel, l'installation des modules et la préparation du système avant fonctionnement.

Installation du logiciel

Installation du logiciel de commande et du système de données

Pour des informations détaillées relatives aux procédures d'installation du logiciel, consultez le manuel du détecteur et les manuels du logiciel.

Installation du logiciel Agilent Lab Advisor

Pour des informations détaillées relatives aux procédures d'installation du logiciel Agilent Lab Advisor, consultez la documentation du logiciel sur le DVD Lab Advisor.

Le logiciel Agilent Lab Advisor remplace et améliore les fonctions de diagnostic jusqu'alors proposées par le logiciel ChemStation.

Le logiciel Agilent Lab Advisor est une application fonctionnant sous Windows qui contrôle les instruments de laboratoire en temps réel et permet donc d'accroître la productivité du système au moyen de notifications automatiques pour les tâches de maintenance et d'entretien basées sur des compteurs sophistiqués. Cela permet de résoudre les problèmes éventuels avant qu'ils n'affectent les résultats. Le logiciel comprend un ensemble complet d'informations et de documentation pour l'utilisateur, un jeu de calculateurs et d'outils pour faciliter la configuration, l'étalonnage et la maintenance de votre instrument, ainsi que des tests et des procédures de diagnostic pour vérifier son bon fonctionnement. Le logiciel Agilent Lab Advisor propose également des informations et des solutions pour les éventuelles erreurs d'instrument qui pourraient survenir. Le logiciel fonctionne avec ou sans les systèmes de données Agilent.

Le logiciel surveille :

- l'état du module CPL,
- la maintenance prédictive (pour indiquer la nécessité d'une mise à niveau ou du remplacement d'une pièce).

De surcroît, le logiciel :

- automatise différents tests utiles,
- tente d'identifier les instruments du réseau local qui sont sous tension et connectés à votre PC ou au réseau de votre laboratoire,
- suggère automatiquement le remplacement des pièces et les tâches de dépannage pour résoudre certains problèmes courants de l'instrument.

Installation des modules

Installation des modules du système

Pour des informations détaillées relatives aux procédures d'installation des modules, reportez-vous aux manuels spécifiques à chaque module. Ces manuels comprennent aussi des informations concernant les caractéristiques des modules, leur maintenance et les pièces.

Intégration au réseau

Pour des informations concernant l'intégration de votre système au réseau, reportez-vous aux manuels d’utilisation des différents modules (chapitre *Configuration réseau*).

Connexions des capillaires et tubes dans le circuit

En fonction de la configuration du système, des capillaires de différents diamètres et longueurs sont utilisés. Ils sont décrits ci-dessous.

Consultez les manuels des modèles pour les connexions de capillaires et tubes internes aux modules.

Connexions pour la configuration de volume de retard standard

Figure 21, page 74 montre les connexions des capillaires et tubes dans le circuit pour la configuration de volume de retard standard du 1260 Infinity Binary LC.

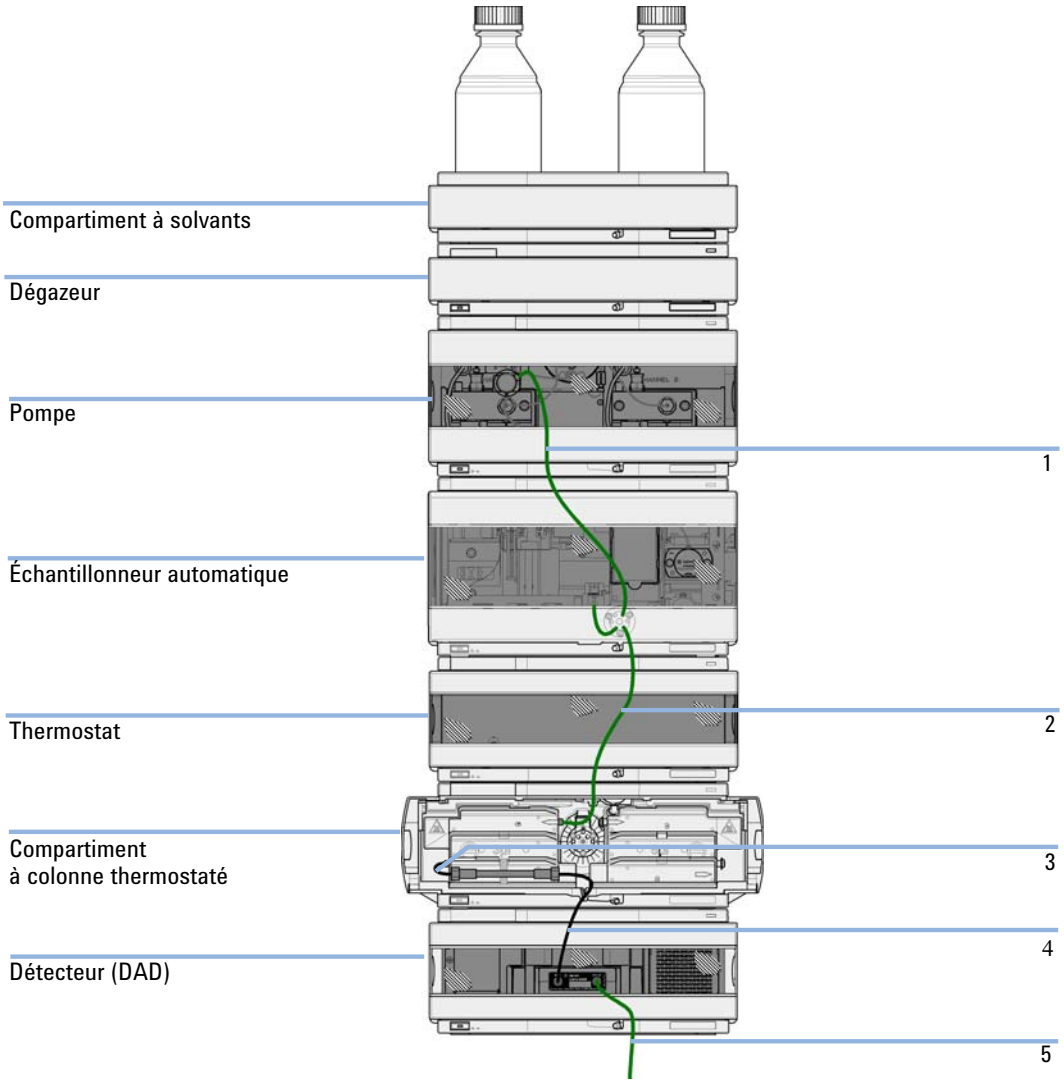


Figure 21 Connexions des capillaires et tubes dans le circuit (configuration du volume de retard standard)

Composant	Référence	Description
1	G1312-87303	Capillaire ST 0,17 mm x 400 mm S/S (Pompe vers l'échantillonneur automatique)
1	G1312-87304	Capillaire ST 0,17 mm x 700 mm S/S (Pompe vers l'échantillonneur automatique refroidi)
2	G1367-87304	Capillaire ST 0,17 mm x 250 mm S/S (Échantillonneur automatique au CCT)
2	01090-87306	Capillaire ST 0,17 mm x 380 nm S/S (Échantillonneur automatique refroidi au CCT)
3	G1316-87300	Capillaire ST 0,17 x 90 mm S/S (CCT à la colonne)
4	G1315-87311	Capillaire ST 0,17 mm x 380 mm S/S (Colonne au DAD)
5	5062-2462	Tube PTFE 0,8 mm x 2 m, commande ultérieure 5 m (DAD à l'évacuation)
5	5062-8535	Kit d'accessoires pour l'évacuation (VWD à l'évacuation)

Connexions pour configuration de volume de retard moyen et faible

Figure 22, page 76 montre les connexions des capillaires et tubes dans le circuit pour la configuration de volume de retard moyen et faible du Binary LC 1260 Infinity.

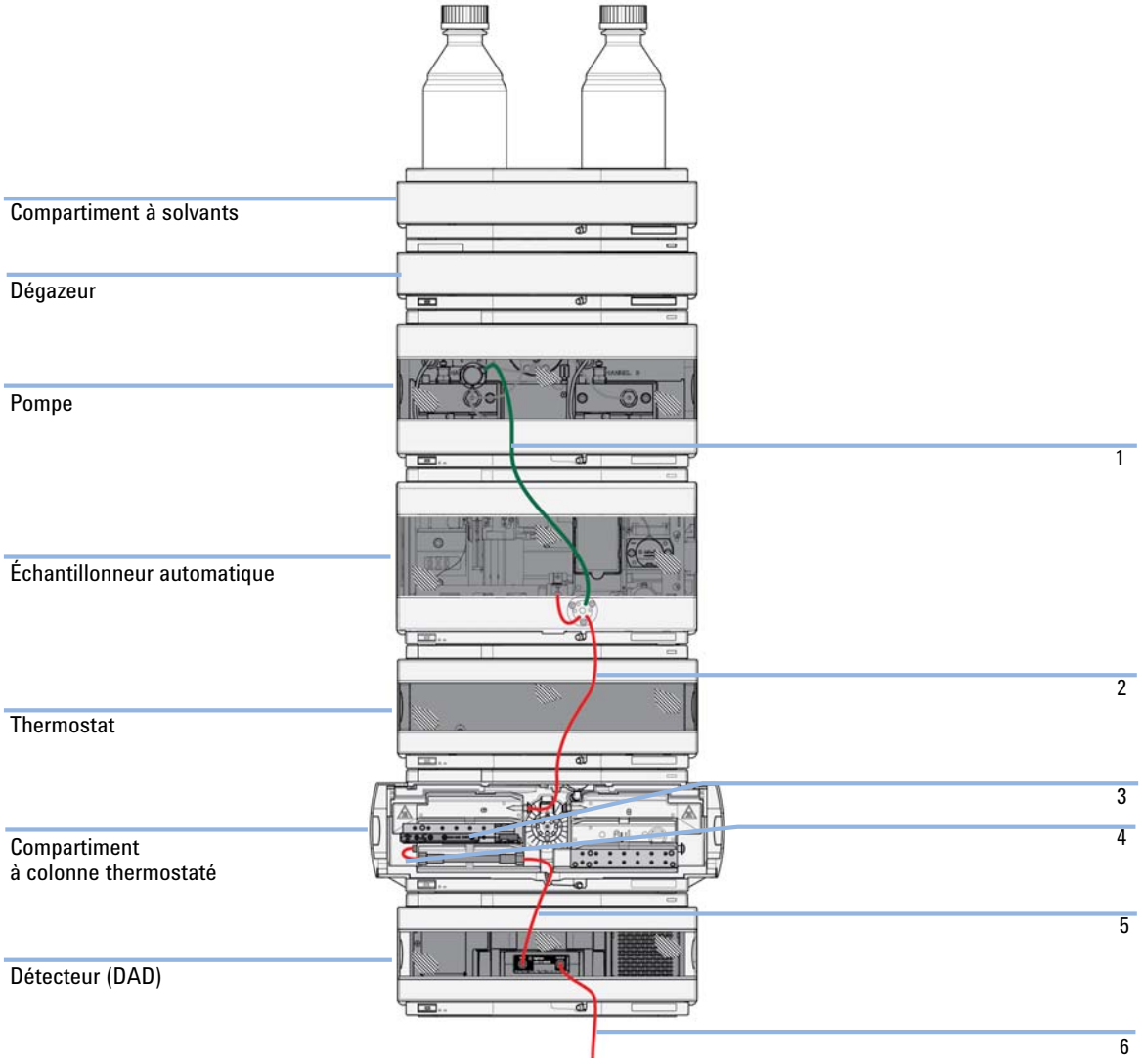


Figure 22 Connexions des capillaires et tubes dans le circuit (configuration du volume de retard moyen et faible)

Composant	Référence	Description
1	G1312-87303	Capillaire ST 0,17 mm x 400 mm S/S (Pompe vers l'échantillonneur automatique)
1	G1312-87304	Capillaire ST 0,17 mm x 700 mm S/S (Pompe vers l'échantillonneur automatique refroidi)
2	G1313-87304	Capillaire ST 0,12 mm x 180 mm S/S (Échantillonneur automatique au CCT)
2	01090-87610	Capillaire ST 0,12 mm x 280 mm S/S (Échantillonneur automatique refroidi au CCT ou à l'élément 3 si installé)
3	G1316-80002	Elément de chauffage long, dessus (0,12 mm de d.i., 1,6 µL de volume interne
3	G1316-80003	Elément de chauffage long, dessous (0,12 mm de d.i., 1,6 µL de volume interne
4	01090-87611	Capillaire ST 0,12 mm x 105 mm S/S (CCT à colonne, inutile si l'élément 3 est installé)
5	G1315-87312	Capillaire ST 0,12 mm x 150 mm S/S (Colonne au DAD)
6	5062-2462	Tube PTFE 0,8 mm x 2 m, commande ultérieure 5 m (DAD à l'évacuation)

Amorçage du système

Amorçage initial

Quand

Avant de pouvoir utiliser un dégazeur ou un tuyau de solvant, il est nécessaire d'amorcer le système. L'isopropanol est recommandé comme solvant d'amorçage en raison de sa miscibilité avec presque tous les solvants HPLC et de ses excellentes propriétés de mouillage.

Pièces nécessaires

Quantité	Description
1	Isopropanol

Préparations

Connectez tous les tuyaux des modules conformément aux instructions fournies dans leurs manuels respectifs.

Remplissez chaque bouteille de solvant avec 100 mL d'isopropanol

Mettez le système sous tension.

AVERTISSEMENT

Lors de l'ouverture des raccords de capillaire ou de tuyau, du solvant peut s'écouler.

La manipulation de solvants et de réactifs toxiques et dangereux peut comporter des risques pour la santé.

➔ Respectez les règles de sécurité (lunettes, gants et vêtements de protection) telles qu'elles figurent dans la fiche de sécurité fournie par le fournisseur du solvant, particulièrement s'il s'agit de produits toxiques ou dangereux.

REMARQUE

L'outil de purge de Lab Advisor peut être utilisé pour purger la pompe automatiquement.

REMARQUE

Si la pompe ne parvient pas à aspirer le solvant contenu dans les bouteilles, vous pouvez utiliser une seringue pour l'aspirer manuellement à travers les tuyaux et le dégazeur.

REMARQUE

Lorsque vous amorcez le dégazeur à vide à l'aide d'une seringue, le solvant est aspiré très rapidement à travers les tuyaux du dégazeur. Le solvant, à la sortie du dégazeur, n'est, par conséquent, pas complètement dégazé. Pompez pendant 10 minutes environ au débit souhaité avant de lancer une analyse. Cela permet au dégazeur à vide de dégazer correctement le solvant présent dans ses tuyaux.

1 Ouvrez la vanne de purge de la pompe.

2 Réglez le débit sur 5 mL/min.

3 Sélectionnez la voie A1.

4 Rétablissez le débit.

5 Observez si le solvant dans le tuyau de la voie A1 coule vers la pompe. Si ce n'est pas le cas, débranchez le tuyau de la vanne de sélection de solvant, fixez une seringue à un adaptateur pour seringue et aspirez le liquide via le dégazeur. Replacez le tuyau sur la vanne de sélection de solvant.

6 Pompez 30 mL d'isopropanol pour supprimer les bulles d'air résiduelles.

7 Passez à l'autre voie de solvant et répétez les étapes 5 et 6 jusqu'à ce que toutes les voies aient été purgées.

8 Arrêtez le débit et fermez la vanne de purge.

Amorçage régulier

Quand

Si le système de pompage est resté hors tension pendant un certain temps (par exemple, une nuit), de l'air se rediffuse dans la voie de solvant entre le dégazeur à vide et la pompe. Si des solvants comprenant des composants volatils sont laissés dans le dégazeur à vide sans être soumis à un débit pendant une période de temps prolongée, une légère parte des composants volatils sera constatée.

Préparations

Mettez le système sous tension.

REMARQUE

L'outil de purge de Lab Advisor peut être utilisé pour purger la pompe automatiquement.

1. Ouvrez la vanne de purge de la pompe (en la tournant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre) et réglez le débit sur 5 mL/min.
2. Rincez le dégazeur sous vide et tous les tuyaux avec au moins 10mL de solvant.
3. Répétez les étapes 1 et 2 pour les autres voies de la pompe binaire.
4. Réglez le débit et la composition pour l'application en question et fermez la vanne de purge.
5. Pompez pendant environ 10 minutes avant de lancer l'application.

Changement des solvants

Quand

Si le solvant d'une voie doit être remplacé par un autre solvant non compatible (les solvants ne sont pas miscibles ou un solvant contient un tampon), il est nécessaire de suivre la procédure ci-dessous pour empêcher l'encrassement de la pompe dû à la précipitation de sel ou à la présence de gouttelettes de liquides résiduelles dans certaines parties du système.

Pièces nécessaires

Quantité	Référence	Description
1		Solvant(s) de purge, voir Tableau 8, page 82
1	5022-2184	Raccord union sans volume mort (ZDV)

Préparations

Enlevez la colonne et remplacez-la par un raccord ZDV

Préparez les bouteilles avec les solvants intermédiaires appropriés (voir Tableau 8, page 82).

1 Si la voie ne contient pas de tampon, passez à l'étape 4.
2 Placez le filtre d'aspiration de solvant dans une bouteille d'eau.
3 Purgez la voie à un débit adapté aux tuyaux installés (en général, 3 – 5 mL/min) pendant 10 minutes.
4 Modifiez le circuit de votre système en fonction de votre application.

ATTENTION

Le sel présent dans les tampons aqueux peut précipiter dans l'isopropanol résiduel.

La précipitation de sels peut boucher les capillaires et le filtre.

➔ Purgez d'abord les voies de solvant contenant des concentrations élevées de sels avec de l'eau avant d'introduire des solvants organiques.

➔ N'exécutez pas les étapes 5 à 7 pour des voies utilisant un tampon aqueux comme solvant.

5 Remplacez la bouteille de solvant par une bouteille d'isopropanol.
6 Purgez la voie à un débit adapté aux tuyaux installés (en général, 3 – 5 mL/min) pendant 5 minutes.
7 Remplacez la bouteille d'isopropanol par une bouteille de solvant destinée à votre application.
8 Répétez les étapes 1 à 7 pour les autres voies de la pompe binaire.

9 Mettez la colonne souhaitée en place, réglez la composition et le débit requis pour votre application, puis équilibrez le système pendant 10 minutes environ avant de lancer une analyse.

Tableau 8 Choix des solvants d'amorçage selon les utilisations

Activité	Solvant	Commentaires
Après une installation	Isopropanol	Meilleur solvant pour purger l'air du système
En cas de passage de la phase inversée à la phase normale (les deux fois)	Isopropanol	Miscible avec presque tous les solvants
Après une installation	Éthanol ou méthanol	Alternative à l'isopropanol (second choix) en cas d'indisponibilité d'isopropanol
Nettoyage du système en cas d'utilisation de solutions tampons	Eau de qualité HPLC	Meilleur solvant pour redissoudre les cristaux de tampon
Après avoir changé de solvant aqueux	Eau de qualité HPLC	Meilleur solvant pour redissoudre les cristaux de tampon
Après l'installation de joints de phase normal (Joints en PE (pqt de 2) (0905-1420))	hexane + 5 % isopropanol	Bonnes propriétés de mouillage

5
Guide de démarrage rapide

À propos du guide de démarrage rapide 84
Préparation du système 85
- Mise sous tension du système 85
- Chargement de la méthode par défaut 86
- Configuration du tracé en ligne 87
- Purge de la pompe 89

Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse 90
- Paramètres de la méthode de contrôle du système avec l'échantillon test isocratique 90
- Mise en place de la méthode 94
- Exécution de la méthode pour une injection unique 96

Traitement des données 98
- Vue Traitement des données 99
- Intégration d'un signal 100
- Définition du rapport 101

Ce chapitre traite de l'acquisition de données et du traitement des données avec le Binary LC 1260 Infinity.

À propos du guide de démarrage rapide

Ce chapitre apporte des informations relatives au fonctionnement du Binary LC Agilent 1260 Infinity. Vous pouvez vous en servir comme guide pour lancer rapidement une première analyse après l'installation, l'utilisant à la fois comme exemple et pour vérifier le fonctionnement global du système. Il comprend également des informations plus détaillées sur les paramètres des méthodes.

Cet exemple explique comment mettre en place et effectuer une analyse avec les colonnes et l'échantillon test fournis avec le Binary LC Agilent 1260 Infinity. L'exemple fait référence aux menus et aux commandes du logiciel OpenLAB CDS ChemStation Edition, mais les mêmes fonctions sont disponibles en utilisant les autres possibilités de commande de l'instrument, à savoir OpenLAB CDS EZChrom Edition et le logiciel MassHunter.

Ci-après, les termes ChemStation et EZChrom désignent toujours, respectivement, Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition et Agilent OpenLAB CDS EZChrom Edition.

REMARQUE

Il est supposé pour cet exemple que le système a été installé, mis sous tension et amorcé (voir « Amorçage initial », page 78). La lampe UV doit être allumée au moins 30 minutes avant de démarrer toute analyse quantitative.

Préparation du système

Mise sous tension du système

Si l'ensemble du système n'est pas encore sous tension et que le logiciel n'indique pas l'état Prêt, suivez les étapes suivantes :

1 Mettez l'ordinateur sous tension et attendez l'affichage du bureau Windows.

2 Mettez sous tension les modules CPL à l'aide du bouton en bas à gauche de chaque module.

Un voyant vert signalant que le module est alimenté s'allume au centre de chaque bouton.

3 Lancez le logiciel de commande de l'ordinateur en cliquant sur l'icône appropriée (le cas échéant). Sinon, sélectionnez **Start > All Programs > Agilent Technologies > OpenLAB > OpenLAB Control Panel**. Sélectionnez l'instrument approprié sous **Instruments** dans le panneau de navigation, puis cliquez sur **Launch online**.

Le logiciel ChemStation s'ouvre dans la vue **Method and Run Control**. Au démarrage, les modules se trouvent en mode Veille à l'état Non prêt, à l'exception de l'échantillonneur automatique qui s'initialise d'emblée et atteint l'état Prêt.

4 Pour allumer chaque module individuellement, effectuez un clic droit sur l'icône appropriée et sélectionnez la commande **Switch [module name] on** dans le menu contextuel.

Sinon, vous pouvez choisir d'allumer tous les modules du système simultanément en cliquant sur le bouton **System On/Off**en bas à droite du schéma du système. L'état du système passe de *Non prêt* (indiqué en jaune) à *Prêt* (indiqué en vert) après un court délai nécessaire pour atteindre les points de consigne.

Chargement de la méthode par défaut

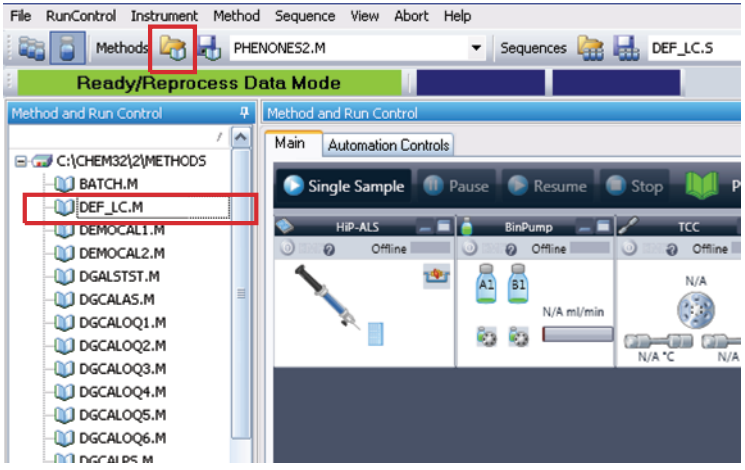
Le logiciel ChemStation dispose d'une méthode par défaut appelé **DEF_LC.M** qui est chargée lors de la première mise en route ou lorsqu'un nouveau modèle de méthode vierge est requis. Celle-ci comprend les paramètres par défaut pour tous les modules.

Cette procédure vous indique comment charger la méthode **DEF_LC.M**. Vous pouvez l'utiliser pour régler tous les paramètres sur les valeurs par défaut, ou pour obtenir un modèle de méthode vierge pour la mise en place d'une nouvelle méthode.

1 Accédez à la vue **Method and Run Control** de ChemStation.

2 Dans la barre de menus, sélectionnez **Method** > **New Method...**, et sélectionnez **DEF_LC.M** dans le menu contextuel.

   Sinon, vous pouvez utiliser l'icône **Load Method** dans la barre de menus, ou double-cliquer sur le nom de méthode **DEF_LC.M** dans l'onglet **Methods** du panneau de navigation.



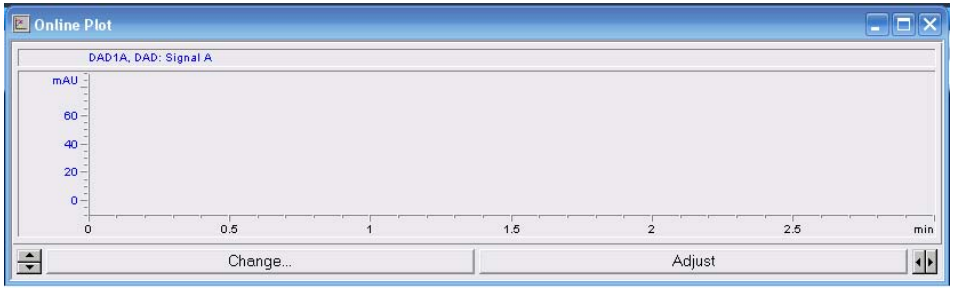
La méthode par défaut (**DEF_LC.M**) comprend un ensemble de paramètres par défaut qui peuvent être modifiés pour créer une nouvelle méthode. Par exemple le débit est réglé sur zéro, et les **Method Information** et l'**Method History** sont vierges.

REMARQUE

Il est à noter qu'il est impossible d'écraser cette méthode lorsque les paramètres sont modifiés. Ainsi, lorsque vous cliquez sur **Save**, vous serez redirigé vers la fonction **Save As...** pour saisir un nouveau nom de méthode.

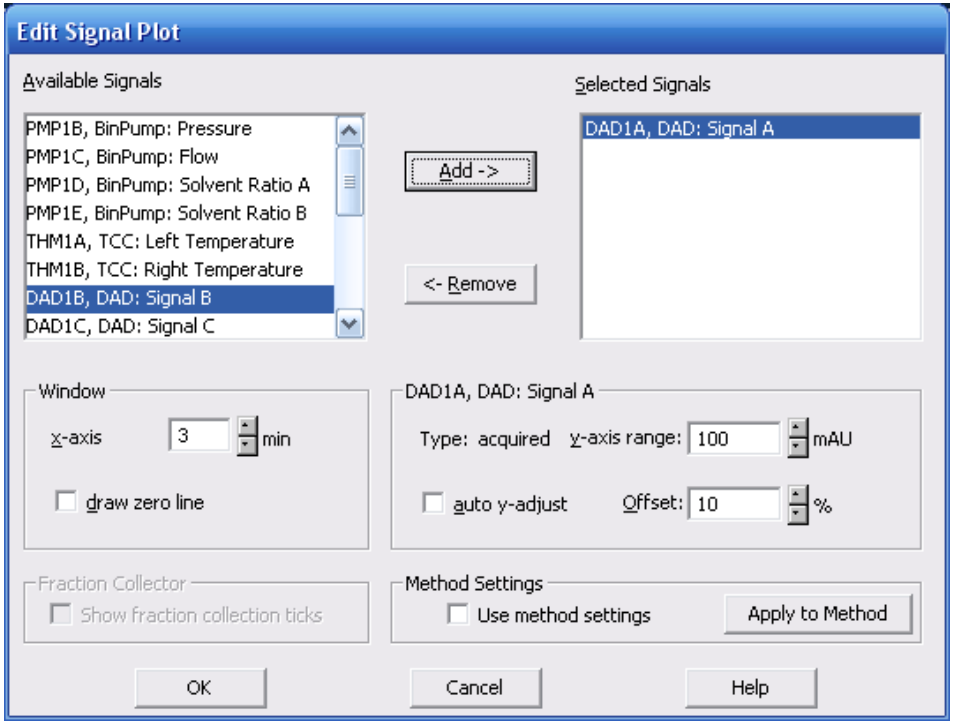
Configuration du tracé en ligne

1 Si la fenêtre **Online Plot** n'est pas visible : Cliquez sur **View > Online Signals > Signal Window 1** pour afficher la fenêtre.



2 Pour configurer le ou les signaux souhaités dans la fenêtre **Online Plot**, cliquez sur **Change...**.

La fenêtre de configuration **Edit Signal Plot** s'affiche.



3 Dans la liste **Available Signals**, sélectionnez les signaux nécessaires, puis cliquez sur **Add** pour les déplacer vers la liste **Selected Signals**.

4 Pour régler les paramètres individuels pour chaque signal, sélectionnez le signal dans la liste **Selected Signal** et réglez les valeurs souhaitées dans la partie inférieure de la fenêtre.

REMARQUE En plus des signaux provenant des détecteurs, vous pouvez afficher les tracés de paramètres tels que la température et la pression. À l'aide du bouton **Apply to Method**, vous pouvez enregistrer les paramètres de cette fenêtre dans la méthode.

La fenêtre **Online Plot** se comporte comme du papier graphique électronique, et enregistre en continu la sortie du ou des détecteurs ainsi que d'autres paramètres de sortie. Les signaux sont tracés à droite de la fenêtre et se déplacent ensuite vers la gauche. Les dernières 90 min des données sont accessibles. Il s'agit d'un outil pratique pour surveiller la ligne de base et observer les injections antérieures. Les échelles des axes des abscisses et des ordonnées peuvent être ajustées directement à l'aide des boutons haut/bas sur chaque axe.

Le bouton **Adjust** dans la fenêtre **Online Plot** déplace le point actuel du signal sélectionné sur la ligne zéro. Le signal sélectionné est indiqué par la couleur des étiquettes de l'axe des ordonnées. Un signal en particulier peut être sélectionné en cliquant sur le signal ou en cliquant la description de signal appropriée en haut du tracé.

Le bouton **Balance** permet de réinitialiser tous les détecteurs.

REMARQUE Les modifications apportées à la fenêtre **Online Plot** n'ont aucune influence sur les données stockées dans les fichiers de données individuels.

Purge de la pompe

Il faut purger la pompe, ...

- Après que la pompe a été amorcée pour la première fois,
- Lorsque la pompe doit être purgée avec du solvant frais avant d'utiliser le système, ou lorsque le solvant doit être remplacé par un autre solvant,
- Si la pompe n'a pas été utilisée depuis plusieurs heures (de l'air peut avoir diffusé le long des tuyaux de solvant et la purge est recommandée),
- En cas de remplissage des réservoirs à solvant (la pompe doit être purgée pour distribuer le solvant frais dans le système), Si un solvant différent va être utilisé, assurez-vous que le nouveau solvant est miscible avec le solvant précédent. Si ce n'est pas le cas, effectuez une étape intermédiaire avec un solvant co-miscible (l'isopropanol est souvent un bon solvant intermédiaire ; consultez le tableau de miscibilité des solvants).

Pour des informations détaillées concernant la procédure de purge, consultez la section « Amorçage régulier », page 80.

Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse

Paramètres de la méthode de contrôle du système avec l'échantillon test isocratique

Pour le contrôle du Binary LC 1260 Infinity, un test avec un mélange test isocratique (Échantillon de vérification isocratique Agilent (01080-68704)) est effectué sur la colonne commandée et fournie avec votre système.

Échantillon de vérification isocratique Agilent (01080-68704) contient les composants suivants dissous dans du méthanol :

- phtalate de diméthyle
- phtalate de diéthyle
- biphényle
- o-terphényle

Les paramètres de méthode pour la séparation de ce mélange test sont résumés dans Tableau 9, page 91 pour la configuration de volume de retard standard et dans Tableau 10, page 92 pour la configuration de volume de retard faible.

Tableau 9 Paramètres de méthode pour une première séparation test, configuration de volume de retard standard

Module	Paramètre	Valeur
Pompe	Solvant A	Eau
	Solvant B	Acétonitrile
	Débit	4,0 mL/min
	Composition du solvant	40 % A, 60 % B
	Temps d'arrêt	1 min (temps de postanalyse 1 min)
Échantillonneur automatique	Injection	1 µL
Compartiment à colonnes	Colonne	• Colonne Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm (959961-902) • Colonne Poroshell 120 EC-C18, 3,0 x 50 mm, 2,7 µm (699975-302) • Colonne Poroshell 120 EC-C18, 4,6 x 50 mm, 2,7 µm (699975-902)
	Température	40 °C
Détecteur	Signal A	Longueur d'onde : 250 nm, bande passante : 4 nm Longueur d'onde de référence : 360 nm, bande passante de référence : 100 nm

Tableau 10 Paramètres de méthode pour une première séparation test, configuration de volume de retard faible

Module	Paramètre	Valeur
Pompe	Solvant A	Eau
	Solvant B	Acétonitrile
	Débit	0,75 mL/min
	Composition du solvant	40 % A, 60 % B
	Temps d'arrêt	1,2 min (temps de postanalyse 1 min)
Échantillonneur automatique	Injection	1 µL
Compartiment à colonnes	Colonne	Colonne : SB-C18, 4,6 x 50 mm, 1,8 µm, 600 bar (827975-902)
	Température	40 °C
Détecteur	Signal	Longueur d'onde : 250 nm, bande passante : 4 nm Longueur d'onde de référence : 360 nm, bande passante de référence : 100 nm

Spécifications de contrôle :

- quatre pics sont visibles sur le chromatogramme
- **Intensity Test** : réussi
- **Wavelength Calibration**±1 nm

Préparation du contrôle

1 Remplissez la bouteille de solvant A d'eau de qualité HPLC. Remplissez la bouteille de solvant B d'acétonitrile de qualité HPLC.

2 S'il est installé, purgez chaque voie du dégazeur en ligne à l'aide de la seringue fournie.

3 Ouvrez le clapet de purge de la pompe et purgez chaque voie à 5 mL/min.

Ceci doit être suffisant pour éliminer l'air du système.

4 Installez la colonne fournie dans le compartiment à colonnes.

5 Rincez la cuve à circulation avec de l'eau de qualité HPLC pendant 5 min.

6 Effectuez un test d'étalonnage de la longueur d'onde et d'intensité, le cas échéant.

7 Laissez le système s'équilibrer aux conditions de contrôle répertoriées dans Tableau 9, page 91 et Tableau 10, page 92 pendant 10 min.

8 Préparez un flacon d'échantillon test isocratique.

Mise en place de la méthode

Cette section montre comment définir rapidement les conditions de méthode d'une analyse.

Prérequis

La méthode par défaut **DEF_LC.M** a été chargée pour la préparation de la nouvelle méthode. Maintenant, vous pouvez modifier les paramètres clés pour créer la nouvelle méthode.

1. Pour accéder rapidement à la fenêtre **Method** pour chaque module, effectuez un clic droit sur le module dans le schéma du système et sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.

   Vous pouvez configurer chaque module de cette manière.

2. Effectuez un clic droit sur la zone de la pompe, puis sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.

   a. Dans la fenêtre **Method** pour la **1260 Infinity Binary Pump**, entrez les paramètres suivants :

   - Débit : 4,0 ml/min
   - Solvant A : Sélectionnez **Water** dans la liste déroulante Compressibilité.
   - Solvant B : Cochez la case pour activer le solvant B.
   - Réglez le pourcentage de B sur 60 %
   - Temps d'arrêt : 1 min
   - Temps de postanalyse : 1 min

   b. Les autres paramètres peuvent conserver leurs réglages par défaut. Cliquez sur **OK** pour quitter la fenêtre.

   Les modifications sont transmises au module de la pompe.

3. Effectuez un clic droit sur la zone de l'échantillonneur automatique, puis sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.

   a. Dans la fenêtre **Method** pour l'**1260 Infinity Autosampler**, entrez les paramètres suivants :

   - Volume d'injection : 1,0 µl
   - Injection avec lavage de l'aiguille
   - Mode Voie de lavage, Durée : 6 s

   b. Les autres paramètres peuvent conserver leurs réglages par défaut. Cliquez sur **OK** pour quitter la fenêtre.

Les modifications sont transmises au module de l'échantillonneur automatique.

4 Effectuez un clic droit sur la zone du compartiment à colonne thermostaté (TCC), puis sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.

   a Dans la fenêtre **Method** pour le **1290 Infinity TCC**, entrez les paramètres suivants :

      - Température gauche 40 °C
      - Température droite Combinée

   b Les autres paramètres peuvent conserver leurs réglages par défaut. Cliquez sur **OK** pour quitter la fenêtre.

      Les modifications sont transmises au module du TCC.

5 Effectuez un clic droit sur la zone du détecteur à barrette de diodes, puis sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.

   a Dans la fenêtre **Method** pour le **1260 Infinity DAD**, entrez les paramètres suivants :

      - **Use Signal**: désactivez tous les signaux sauf le **Signal A** en décochant les cases appropriées.
      - Signal A : 254 nm, bande passante 4 nm, réf. 550 nm, bande passante 100 nm
      - Largeur de pic : 0,02

   b Dans la section **Advanced**, réglez **Spectrum Store** sur **All**.

   c Les autres paramètres peuvent conserver leurs réglages par défaut. Cliquez sur **OK** pour quitter la fenêtre.

      Les modifications sont transmises au module du DAD.

6 Tous les paramètres de module nécessaires ont maintenant été saisis. Sélectionnez **Method > Save Method As...** et entrez `ISO-1.M` pour sauvegarder la méthode sous un nouveau nom.

   Pour ne pas modifier le modèle de méthode par défaut, le logiciel ChemStation ne vous laissera pas enregistrer la méthode avec le nom **DEF_LC.M**.

7 Laissez le système s'équilibrer pendant au moins 10 min, et vérifiez que la ligne de base dans le **Online Plot** est stable avant de démarrer l'analyse.

Exécution de la méthode pour une injection unique

Cette section explique comment exécuter l'analyse d'une injection unique d'échantillon test isocratique à l'aide des conditions saisies dans la section précédente.

Deux modes d'exécution d'analyses existent avec ChemStation :

- **Run Method** : pour des injections uniques, par exemple lors du développement interactif de méthodes, à l'aide des réglages des paramètres actifs à un moment donné ;
- **Run Sequence** : pour des séries d'injections automatisées à partir de plusieurs flacons, éventuellement avec plusieurs méthodes. Pour plus de détails, reportez-vous aux manuels du logiciel ChemStation.

1 Cliquez sur l'icône **Select Run Method Task** .

2 Si les conditions de méthode souhaitées ne sont pas chargées actuellement, sélectionnez **Method > Load Method** ou l'icône de la barre de menus pour les charger.

REMARQUE Si des modifications ont été apportées à une méthode chargée mais non encore enregistrée, un astérisque jaune est affiché sur l'icône d'état de la méthode. L'injection peut être réalisée sans enregistrer au préalable les modifications des paramètres. Le logiciel ChemStation enregistre toujours une copie des paramètres d'acquisition dans le fichier de données ACQ.TXT pour conserver les paramètres de la méthode d'origine.

3 Placez le flacon d'échantillon à la position 1 : il s'agit de la position avant des 10 x 2 ml positions de flacons sur le côté droit du plateau à flacons.

4 Sélectionnez **Run Control > Sample Info** et saisissez les paramètres d'échantillon requis.

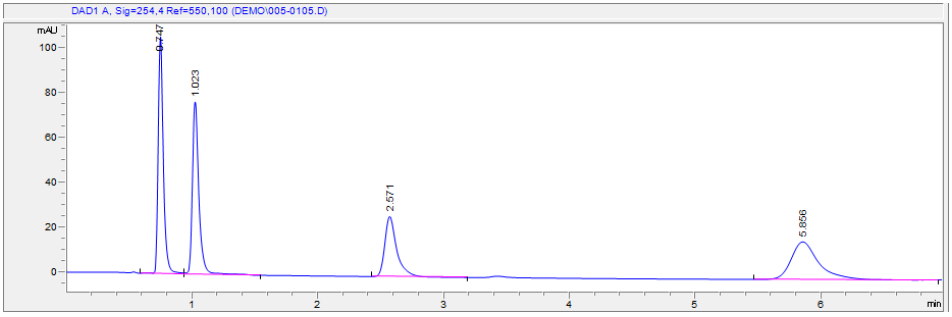
Par exemple :

- **Subdirectory** (en option)
- **Name Pattern**
- **Vial/Location**
- **Sample name**
- **Comment**

5 Si le système a déjà atteint l'équilibre et que la ligne de base est stable, cliquez sur **Run Method** dans la fenêtre **Sample Info** pour démarrer l'injection. Sinon, cliquez sur **OK** et quand tout est prêt, sélectionnez **Run Control > Run Method**. L'élément est ajouté à la **Run Queue** puis démarre automatiquement à partir de là.

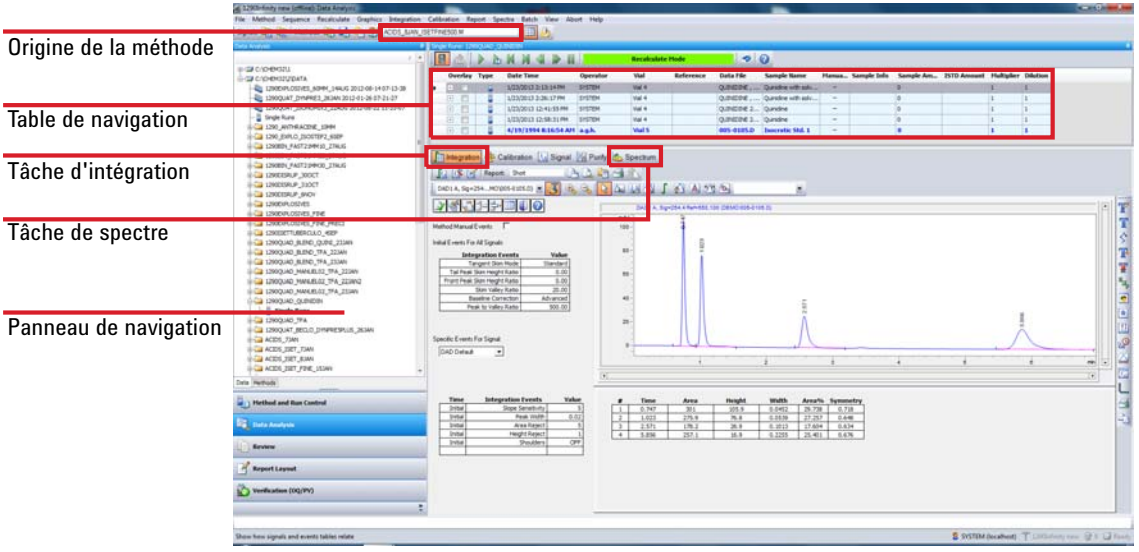
6 L'injection est réalisée et le chromatogramme apparaît dans la fenêtre **Online Plot**. L'acquisition de données se termine lorsque le **Stop Time** est atteint.

Le chromatogramme doit ressembler à celui-ci :



Traitement des données

Dans le logiciel ChemStation, une méthode contient tous les paramètres nécessaires à l'acquisition des données (gestion du système) et à le traitement des données (traitement des données pour obtenir des résultats quantitatifs et qualitatifs). Cette section décrit brièvement l'intégration et les rapports de traitement des données pour que les séparations effectuées plus haut dans ce chapitre puissent être intégrées et les rapports imprimés. Pour des informations supplémentaires concernant le traitement des données, y compris l'utilisation de l'étalonnage pour la quantification, consultez le manuel du logiciel ChemStation.



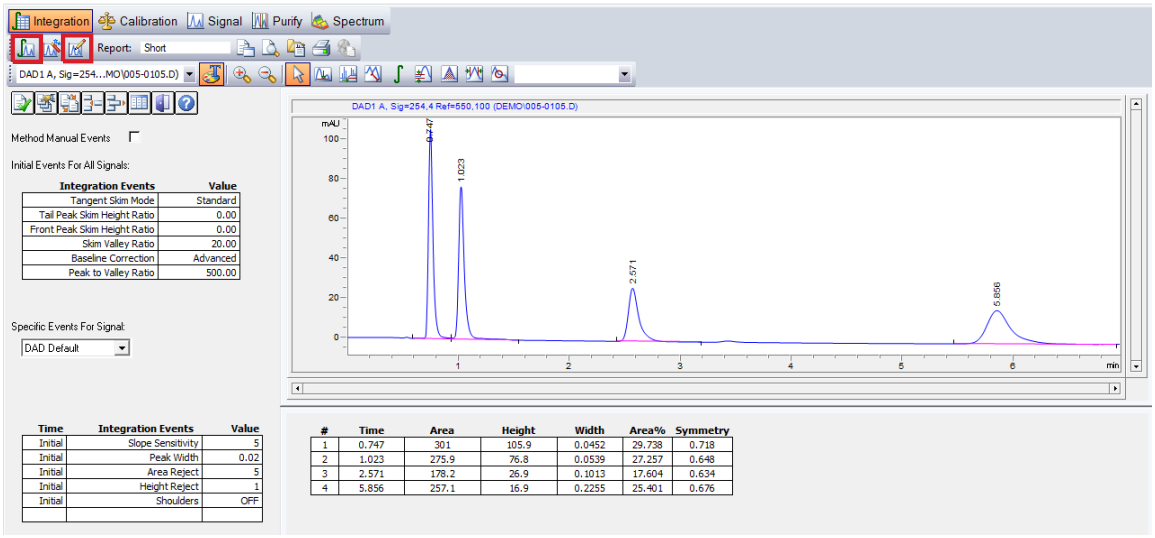
Vue Traitement des données

Pour ouvrir un chromatogramme dans la vue Data Analysis :

1. Lancez une session de ChemStation hors connexion.
2. Cliquez sur **Data Analysis** dans le coin inférieur gauche de l'écran.
3. Dans le panneau de navigation, recherchez le répertoire de données contenant les fichiers de données. Toutes les données d'injections uniques sont regroupés dans un sous-groupe nommé **Single Runs**. Double-cliquez sur **Single Runs** pour charger ces fichiers de données dans le tableau de navigation.
4. Sélectionnez un fichier dans le tableau de navigation, et double-cliquez sur le fichier pour afficher le chromatogramme dans la visionneuse.

Intégration d'un signal

1 Sélectionnez l'outil Tâche d'intégration (voir la figure ci-dessous). Les icônes **Integrate** et **Set Integration Events Table** sont entourées dans la figure illustrée ci-dessous.



2 Cliquez sur l'icône **Set Integration Events Table** pour ouvrir le tableau comme illustré ci-dessus.

3 Réglez la **Baseline Correction** sur **Advanced** pour les analyses à gradient.

4 Réglez la **Slope Sensitivity** sur 5 .

Une valeur supérieure intègre les pics à pente plus forte en ignorant les pics à pente moins élevée.

5 Réglez la **Peak Width** sur la valeur du pic d'intérêt le plus étroit, soit environ 0,02 dans cet exemple.

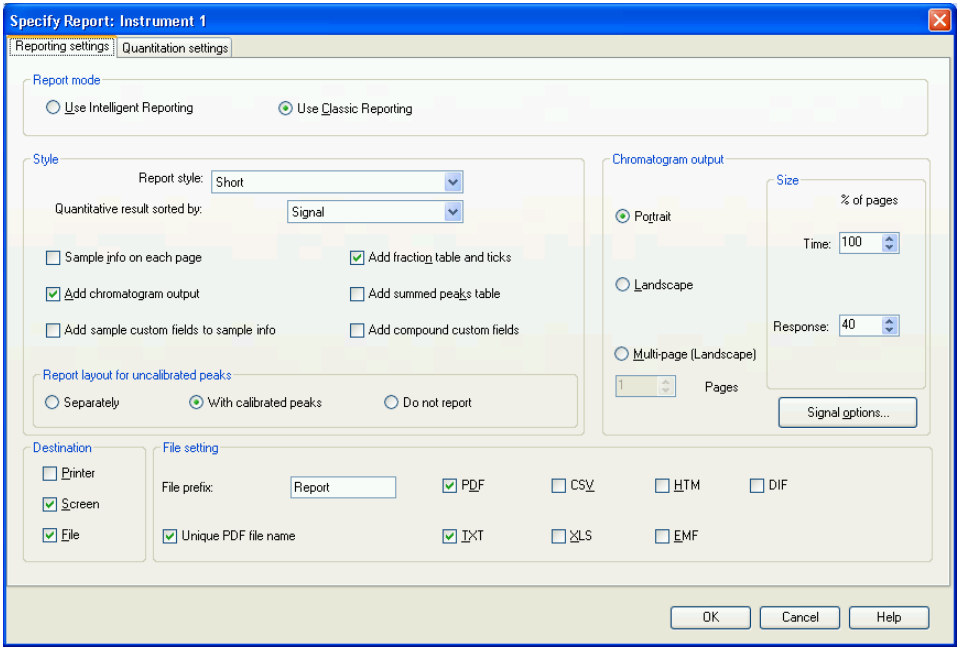
6 Les paramètres **Area Reject** et **Height Reject** peuvent être réglés pour rejeter les pics plus petits.

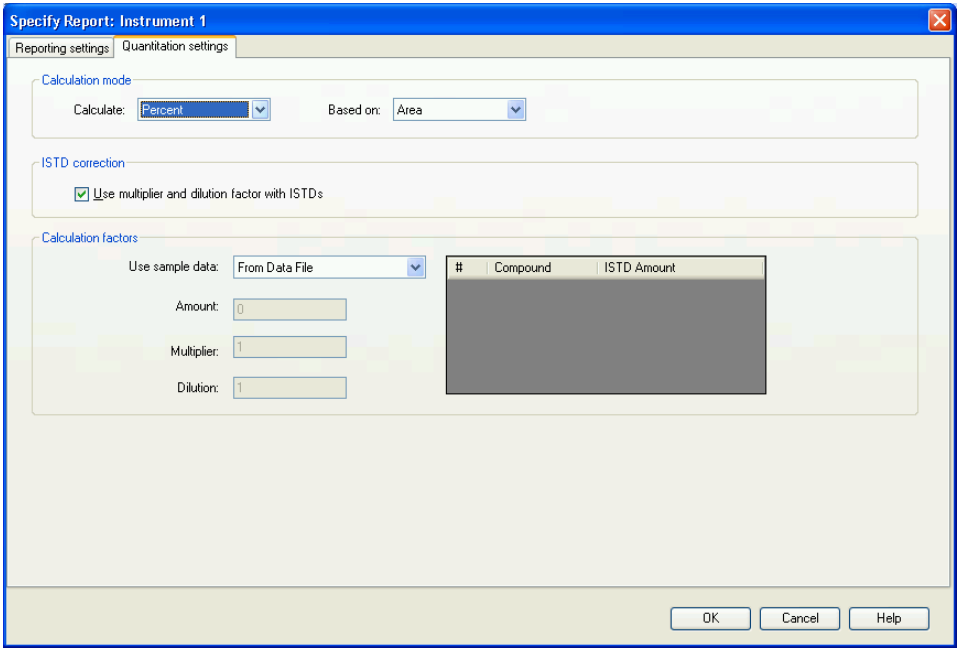
7 Cliquez sur l'icône **Integrate** pour actualiser les résultats en utilisant ces nouveaux paramètres.

8 Quittez le tableau d'**Integration Events** à l'aide de l'icône verte en forme de coche .

Définition du rapport

1 Dans la barre de menus, cliquez sur **Report > Specify Report** pour afficher la fenêtre illustrée dans la figure ci-dessous.





2 À l'aide des exemples de paramètres montrés dans les figures ci-dessus, vous pouvez faire afficher un rapport en pourcentage d'aire à l'écran.

3 Dans la section **Destination**, sélectionnez **Printer** pour imprimer une version papier, ou **File** puis **PDF** pour obtenir un fichier de rapport en format PDF enregistré dans le fichier de données. (Le fichier de données avec le suffixe .D est en réalité un répertoire. Le fichier de rapport peut être visionné directement dans ChemStation. Il est également accessible dans le répertoire en utilisant l'explorateur de fichiers normal de Windows.)

4 Sauvegardez à nouveau la méthode pour vous assurer que les paramètres des rapports sont enregistrés pour les prochaines utilisations de la méthode.

   À la prochaine utilisation de la méthode, ces événements d'intégration et ces paramètres de rapport serviront à établir le rapport.

Cette section vient compléter le bref description des fonctionnalités d'Analyse des données du logiciel ChemStation. Vous pouvez consulter les manuels du logiciel ChemStation, ainsi que le système d'aide en ligne pour plus de renseignements concernant les fonctionnalités performantes du logiciel ChemStation.

6 Annexe

Informations relatives à la sécurité 104
Informations sur les solvants 107
Informations sur les matériaux 107
Agilent Technologies sur Internet 112
Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Modifier l'ensemble de la méthode 113
Informations sur la méthode 115
Instrument/Acquisition 116
Traitement des données 132
Liste de contrôle de l'exécution 139

Ce chapitre apporte des informations complémentaires concernant la sécurité, les aspects juridiques, l'Internet et la configuration d'une méthode.

Informations relatives à la sécurité

Informations générales de sécurité

Les consignes générales de sécurité suivantes doivent être respectées lors de toutes les phases de fonctionnement, d'entretien et de réparation de cet instrument. Le non-respect de ces consignes ou des avertissements spécifiques énoncés ailleurs dans ce manuel, est en violation des normes de sécurité applicables à la conception, à la fabrication et à l'usage prévu de l'instrument. Agilent Technologies ne peut être tenu responsable du non-respect de ces exigences par le client.

AVERTISSEMENT

Vérifiez la bonne utilisation des équipements.

La protection fournie par l'équipement peut être altérée.

➔ Il est recommandé à l'opérateur de cet instrument de l'utiliser conformément aux indications du présent manuel.

Normes de sécurité

Cet instrument est un instrument de classe de sécurité I (comportant une borne de mise à la terre) et a été fabriqué et contrôlé conformément aux normes de sécurité internationales.

Fonctionnement

Avant de brancher l'alimentation électrique, effectuez chaque étape de la procédure d'installation. Par ailleurs, vous devez respecter les consignes suivantes.

Ne retirez pas les capots de l'instrument pendant son fonctionnement. Avant la mise sous tension de l'instrument, toutes les bornes de mise à la terre, rallonges électriques, transformateurs et dispositifs qui y sont raccordés doivent être reliés à une terre de protection par le biais d'une prise de masse. Toute

interruption de la connexion à la terre de protection crée un risque d'électrocution pouvant entraîner des blessures graves. Si l'intégrité de cette protection devient suspecte, l'instrument doit être mis hors service et son utilisation doit être interdite.

Assurez-vous que les fusibles sont remplacés uniquement par des fusibles à courant nominal spécifié et de type spécifié (fusion normale, temporisés, etc.). N'utilisez pas de fusibles réparés et ne court-circuitez pas les porte-fusibles.

Certains des réglages décrits dans le manuel sont effectués sur un instrument sous tension dont les capots de protection ont été retirés. Les potentiels présents en de nombreux points peuvent, en cas de contact, causer des blessures.

Il convient d'éviter, dans la mesure du possible, d'effectuer des opérations de réglage, de maintenance et de réparation sur un instrument ouvert sous tension. Si c'est inévitable, ces opérations doivent être effectuées par une personne qualifiée et consciente du danger. Ne tentez pas d'effectuer une opération de maintenance interne ou un réglage sans la présence d'une autre personne capable de donner les premiers secours et d'assurer une réanimation. Ne remplacez pas les composants lorsque le câble d'alimentation est branché.

N'utilisez pas l'instrument en présence de gaz ou fumées inflammables. Dans un tel environnement, le fonctionnement de tout instrument électrique représente un danger certain.

N'effectuez pas de substitutions de pièces ou des modifications non autorisées.

Il se peut que les condensateurs situés à l'intérieur de l'instrument soient encore chargés, bien que l'instrument ait été débranché de sa source d'alimentation. Des tensions dangereuses sont présentes dans cet instrument, capables de causer des blessures graves. Vous devez procéder avec extrême précaution lorsque vous manipulez, testez et ajustez cet instrument.

Lorsque vous manipulez des solvants, respectez les règles de sécurité (lunettes, gants et vêtements de protection) telles qu'elles figurent dans la fiche de sécurité fournie par le fournisseur du solvant, particulièrement s'il s'agit de produits toxiques ou dangereux.

Symboles de sécurité

Tableau 11 Symboles de sécurité

Symbole	Description
	L'appareil est marqué de ce symbole quand l'utilisateur doit consulter le manuel d'instructions afin d'éviter les risques de blessure de l'opérateur et de protéger l'appareil contre les dommages.
	Indique des tensions dangereuses.
	Indique une borne de terre protégée.
	Indique qu'il est dangereux pour les yeux de regarder directement la lumière produite par la lampe au deutérium utilisée dans ce produit.
	L'appareil comporte ce symbole pour indiquer qu'il présente des surfaces chaudes et que l'utilisateur ne doit pas les toucher lorsqu'elles sont chaudes.

AVERTISSEMENT

Un AVERTISSEMENT

vous met en garde contre des situations qui pourraient causer des blessures corporelles ou entraîner la mort.

➔ N'allez pas au-delà d'un avertissement tant que vous n'avez pas parfaitement compris et rempli les conditions indiquées.

ATTENTION

Le message ATTENTION

vous prévient lors de situations risquant d'entraîner la perte de données ou d'endommager l'équipement.

➔ N'allez pas au-delà d'une mise en garde « Attention » tant que vous n'avez pas parfaitement compris et rempli les conditions indiquées.

Informations sur les solvants

Observez les recommandations suivantes lors de l'utilisation de solvants.

- Observez les recommandations afin d'éviter le développement d'algues, voir les manuels de la pompe.
- Les petites particules peuvent obstruer les capillaires et les vannes de manière irréversible. Il faut donc toujours filtrer les solvants avec des filtres de 0,4 µm.
- L'utilisation de solvants qui pourrait avoir un effet corrosif sur les pièces du circuit est à éviter ou à minimiser. Consultez les spécifications relatives à la plage de pH fournies pour les différentes pièces comme les cuves à circulation, les matériaux des vannes etc. ainsi que les recommandations fournies dans les prochains chapitres.

Informations sur les matériaux

Les matériaux dans le circuit sont sélectionnés avec soin d'après les expériences d'Agilent dans le développement d'instruments de la meilleur qualité pour l'analyse CPL depuis plusieurs décennies. Ces matériaux présentent une excellente solidité dans des conditions de CPL typiques. Pour toute condition spéciale, veuillez consulter la section Informations sur les matériaux ou contacter Agilent.

Avis de non-responsabilité

Les données suivantes ont été rassemblées auprès de sources externes et servent de référence. Agilent ne peut pas garantir leur exactitude ni leur intégralité. Les données sont basées sur des bibliothèques de compatibilité, qui ne sont pas spécifiques à l'estimation à long terme dans des conditions spécifiques mais très variables des systèmes CPL, des solvants, mélanges de solvants et échantillons. Ces informations ne peuvent pas non plus être généralisées en raison des effets catalytiques des impuretés telles que les ions métalliques, les agents complexants, l'oxygène, etc. En dehors de la corrosion chimique pure, d'autres effets tels que la corrosion électrique, les charges électrostatiques (surtout pour les solvants organiques non conducteurs), le gonflement des

pièces en polymère, etc. doivent être pris en compte. La plupart des données disponibles sont relatives à la température ambiante (généralement 20 – 25 °C, 68 – 77 °F). Si une corrosion est possible, elle est généralement plus rapide à des températures plus élevées. En cas de doute, veuillez consulter la documentation technique sur la compatibilité chimique des matériaux.

PEEK

Le PEEK (polyéther-éther-kétone) associe d'excellentes propriétés relatives à la résistance chimique, la stabilité mécanique et thermique. Il est stable dans une plage de pH de 1 à 12,5 et inerte dans de nombreux solvants courants. Il existe plusieurs incompatibilités connues avec les produits chimiques tels que le chloroforme, le chlorure de méthylène, le tétrahydrofurane, le diméthylsulfoxyde > 1 %, les acides forts (acide nitrique > 10 %, acide sulfurique > 10 %, acide trichloroacétique, acides sulfoniques), les halogènes ou solutions halogènes aqueuses, le phénol et ses dérivés (crésols, acide salicylique, etc.). Lorsqu'il est utilisé au-dessus de la température ambiante, le PEEK est sensible aux bases et à divers solvants organiques, ce qui peut le faire gonfler.

Polyimide

Agilent utilise un polyimide semi-cristallin pour les joints de rotor dans les clapets et les sièges d'aiguilles dans les échantillonneurs automatiques. L'un des fournisseurs de polyimide est DuPont, dont la marque de polyimide est Vespel, également utilisé par Agilent.

Le polyimide est stable dans une plage de pH entre 1 et 10 et dans la plupart des solvants organiques. Il est incompatible avec les acides minéraux concentrés (par ex. l'acide sulfurique), l'acide acétique glacial, le diméthylsulfoxyde et le tétrahydrofurane. Il est également dégradé par les substances nucléophiles telles que l'ammoniaque (par ex. sels d'ammonium en conditions basiques) ou les acéctates.

Polyéthylène (PE)

Agilent utilise des mélanges d'UHMW (poids muléculaire ultra-élevé)-PE/PTFE pour les joints de piston et de rinçage jaunes, utilisés dans les pompes 1290 Infinity et pour les applications en phase normale dans les pompes 1260 Infinity.

Le polyéthylène a une bonne stabilité avec la plupart des solvants inorganiques courants, y compris les acides et les bases dans une plage de pH de 1 à

12,5 . Il est compatible avec de nombreux solvants organiques utilisés dans les systèmes chromatographiques comme le méthanol, l'acétonitrile et l'isopropanol. Il a une stabilité limitée avec les hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et halogénés, le tétrahydrofurane, le phénol et ses dérivés, les acides et bases concentrés. Pour les applications en phase normale, la pression maximale doit être limitée à 200 bar.

Tantale (Ta)

Le tantale est inerte avec la plupart des solvants CPL courants et presque tous les acides à l'exception de l'acide fluorique et des acides avec du trioxyde de soufre libre. Il peut être coorodé par les bases fortes (par ex. solutions d'hydroxyde > 10 %, diéthylamine). Il est déconseillé de l'utiliser avec de l'acide fluorique et des fluorides.

Acier inoxydable (inox)

L'acier inoxydable ne réagit pas avec de nombreux solvants communs. Il est stable en présence d'acides et de bases dans une plage de pH de 1 à 12,5 . Toutefois, il peut être corrodé par des acides dont le pH est en dessous de 2,3 . Il peut également se corroder dans les solvants suivants :

- des solutions d'halogénures alcalins, leurs acides respectifs (par exemple, l'iodure de lithium, le chlorure de potassium, etc.) et des solutions aqueuses d'halogènes.
- Des concentrations élevées d'acides inorganiques, tels que l'acide sulfurique ou nitrique, et des solvants organiques en particulier aux températures élevées (si votre méthode chromatographique le permet, remplacez ces acides par de l'acide phosphorique ou un tampon phosphate, moins corrosifs pour l'acier inoxydable).
- Des solvants ou mélanges halogénés qui forment des radicaux et/ou des acides, comme :

  $2\ CHCl_3 + O_2 \rightarrow 2\ COCl_2 + 2\ HCl$

  Cette réaction, dans laquelle l'acier inoxydable joue sans doute le rôle de catalyseur, se produit rapidement avec le chloroforme sec si le processus de séchage élimine l'alcool stabilisant.
- Les éthers de qualité chromatographique, qui peuvent contenir des peroxydes (par exemple THF, dioxane, éther diisopropylique). De tels éthers doivent être filtrés avec de l'oxyde d'aluminium sec qui adsorbe les peroxydes.

- Des solutions d'acides organiques (acide acétique, acide formique, etc.) dans des solvants organiques. Par exemple, une solution d'acide acétique à 1 % dans le méthanol peut attaquer l'acier.
- Les solutions contenant des agents complexants forts, par exemple l'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA).
- Les mélanges de tétrachlorure de carbone avec l'isopropanol ou le THF.

Carbone amorphe (DLC)

Le carbone amorphe est inerte à la plupart des acides, bases et solvants courants. Il n'existe aucune incompatibilité documentée pour les applications CPL.

Silice fondu et quartz (SiO_2)

Le silice fondu est utilisé dans les cuves à circulation et capillaires 1290 Infinity. Le quartz est utilisé pour les fenêtres de cuves à circulation classiques. Il est inerte à tous les solvants et acides courants, à l'exception de l'acide hydrofluorique et des solvants acides contenant des fluorides. Il est corrodé par des bases fortes et ne doit pas être utilisé à un pH supérieur à 12 à température ambiante. La corrosion des fenêtres de cuve à circulation peut avoir un effet négatif sur les résultats de mesure. Pour un pH supérieur à 12, l'utilisation de cuves à circulation avec des fenêtres en saphir est recommandée.

Or

L'or est inerte à tous les solvants CPL courants, les acides et les bases dans la plage de pH spécifiée. Il peut être corrodé par les cyanures complexants et les acides concentrés comme l'eau régale.

Oxyde de zirconium (ZrO_2)

L'oxyde de zirconium est inerte à la plupart des acides, bases et solvants courants. Il n'existe aucune incompatibilité documentée pour les applications CPL.

Platine/iridium

Le platine/l'iridium est inerte à la plupart des acides, bases et solvants courants. Il n'existe aucune incompatibilité documentée pour les applications CPL.

Polymères fluorés (PTFE, PFA, FEP, FFKM)

Les polymères fluorés comme le PTFE (polytétrafluoroéthylène), PFA (perfluoroalkoxy) et FEP (éthylène propylène fluoré) sont inertes à la plupart des acides, bases et solvants courants. Le FFKM est du caoutchouc perfluoré, qui résiste aussi à la plupart des produits chimiques. En tant qu'élastomère, il peut gonfler dans certains solvants organiques tels que les hydrocarbures halogénés.

Les tubes en copolymère TFE/PDD, utilisés dans tous les dégazeurs Agilent à l'exception du G1322A, ne sont pas compatibles avec les solvants fluorés tels que Freon, Fluorinert ou Vertrel. Ils ont une durée de vie limitée en présence d'hexafluoroisopropanol (HFIP). Afin de garantir la plus longue durée de vie possible avec le HFIP, il est préférable de dédier une chambre spéciale à ce solvant, de ne pas mélanger les solvants et de ne pas laisser la chambre sécher. Pour optimiser la durée de vie du capteur de pression, ne laissez pas le HFIP dans la chambre quand l'unité est éteinte.

Saphir, rubis et céramiques Al_2O_3

Le saphir, le rubis et les céramiques à base d'oxyde d'aluminum Al_2O_3 sont inertes à presque tous les acides, bases et solvants courants. Il n'existe aucune incompatibilité documentée pour les applications CPL.

Agilent Technologies sur Internet

Pour les toutes dernières informations sur les produits et les services Agilent Technologies, visitez notre site Internet à l'adresse suivante :

http://www.agilent.com

Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Modifier l'ensemble de la méthode

Dans le logiciel ChemStation, une méthode contient tous les paramètres nécessaires à l'acquisition des données (gestion du système) et à le traitement des données (traitement des données pour obtenir des résultats quantitatifs et qualitatifs). Les paramètres sont accessibles au moyen d'une série d'écrans qui traitent chacun d'un module ou d'une fonction. Vous pouvez accéder à ces écrans en cliquant sur une icône de l'interface utilisateur ou sur la barre de menus et ses menus déroulants. Une nouvelle méthode est créée en chargeant et modifiant une méthode existante, ou en chargeant et modifiant le modèle de méthode vierge **DEF_LC.M**.

Pour modifier quelques paramètres seulement, vous pouvez accéder directement aux fenêtres de configuration appropriées correspondant à ces paramètres. Cependant, les utilisateurs moins expérimentés peuvent trouver qu'il est plus facile d'utiliser la fonction **Edit Entire Method** car celle-ci vous amène automatiquement de fenêtre en fenêtre. Pour utiliser cette fonction, cliquez sur le menu **Method > Edit Entire Method**. La boîte de dialogue **Check Method Sections to Edit** s'affiche :

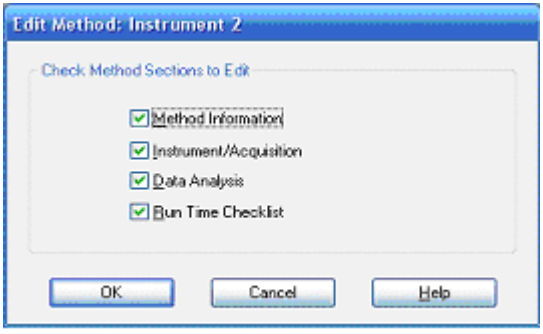


Figure 23 Choix des sections de méthode à modifier

Cette boîte de dialogue résume les sections qui seront parcourues, et permet de sauter certaines sections en les décochant.

En fonction des sections sélectionnées, plusieurs écrans seront affichés successivement :

- La section **Method Information** comprend un texte de description de la méthode.
- La section **Instrument/Acquisition** comprend :
  - les paramètres d'injection,
  - les paramètres de la pompe,
  - les paramètres du four,
  - les paramètres du détecteur, et
  - les courbes de l'instrument.
- La section **Data Analysis** comprend :
  - les détails de signal,
  - les paramètres d'intégration, et
  - les paramètres de création des rapports.
- La section **Run Time Checklist** comprend les parties de la méthode à exécuter.

REMARQUE

Dans la fonction **Edit Entire Method**, le fait de cliquer sur **OK** ferme l'écran en cours et ouvre l'écran suivant. Il s'agit d'un processus à sens unique.

Si vous cliquez accidentellement sur **OK** avant d'avoir effectué toutes les modifications, cliquez sur **Cancel** et recommencez **Edit Entire Method** depuis le début. Sinon, continuez à effectuer vos modifications et revenez à l'écran non terminé à la fin du processus. Lorsque vous cliquez sur **Cancel**, un bouton **Skip** apparaît et permet de sauter les écrans restants.

Informations sur la méthode

Vous pouvez également accéder à l'écran **Method Information** en utilisant le menu **Method > Method Information** ou en effectuant un clic droit sur l'interface utilisateur.

Cette fenêtre permet de saisir des informations concernant la méthode. Ces informations seront affichées au-dessus du schéma du système sur l'écran **Method and Run Control** lorsque cette méthode est chargée et réside dans la mémoire.

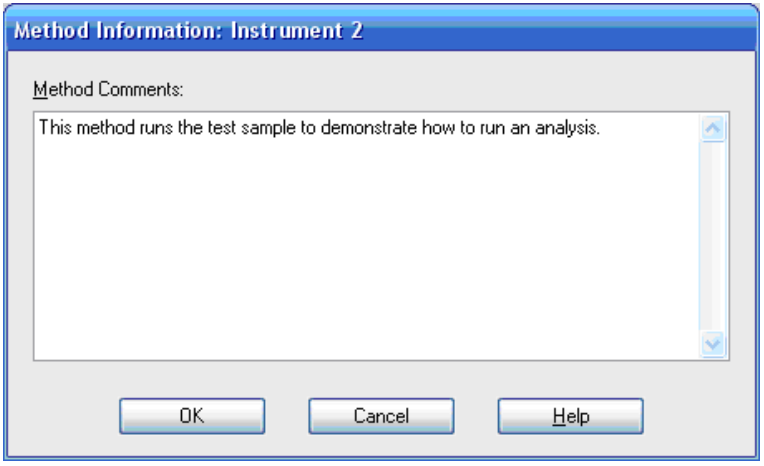


Figure 24 Informations sur la méthode

Instrument/Acquisition

Configuration de la méthode de l'instrument

Vous pouvez accéder directement à l'écran **Setup Method** en utilisant le menu **Instrument > Setup Instrument Method...**, ou en effectuant un clic droit sur toute icône de module de l'interface utilisateur et en sélectionnant **Method...** dans le menu contextuel. La prochaine étape de la fonction **Edit Entire Method** est l'écran **Setup Method** qui comprend six onglets pour les différents modules et fonctions.

Les onglets sont :

- Échantillonneur automatique haute performance (**HiP-ALS**)
- **HiP-ALS Injector Program**
- Pompe binaire (**BinPump**)
- Compartiment à colonne thermostaté (**TCC**)
- Détecteur à barrette de diodes (**DAD**)
- **Instrument Curves**

Pour changer d'onglet, cliquez sur le nom de l'onglet en haut de l'écran. Lorsque vous changez des paramètres, vous pouvez transmettre chaque modification à l'instrument immédiatement en cliquant sur **Apply**. Sinon, si vous pouvez cliquer sur **OK** une fois que vous avez terminé de modifier tous les onglets pour transmettre tous les paramètres modifiés aux modules, fermer l'écran et passer à l'étape suivante.

Les onglets de saisie des paramètres sont d'aspect similaire dans tous les logiciels de commande (ChemStation, EZChrom, MassHunter, etc.) grâce à l'utilisation par Agilent de pilotes RC.Net communs pour les modules de l'instrument.

Pour exécuter l'exemple de séparation, comme pour la plupart des méthodes, il n'est pas nécessaire de modifier tous les paramètres disponibles. Cependant, par souci d'exhaustivité, ils sont tous décrits dans les sections suivantes.

Onglet Échantillonneur automatique

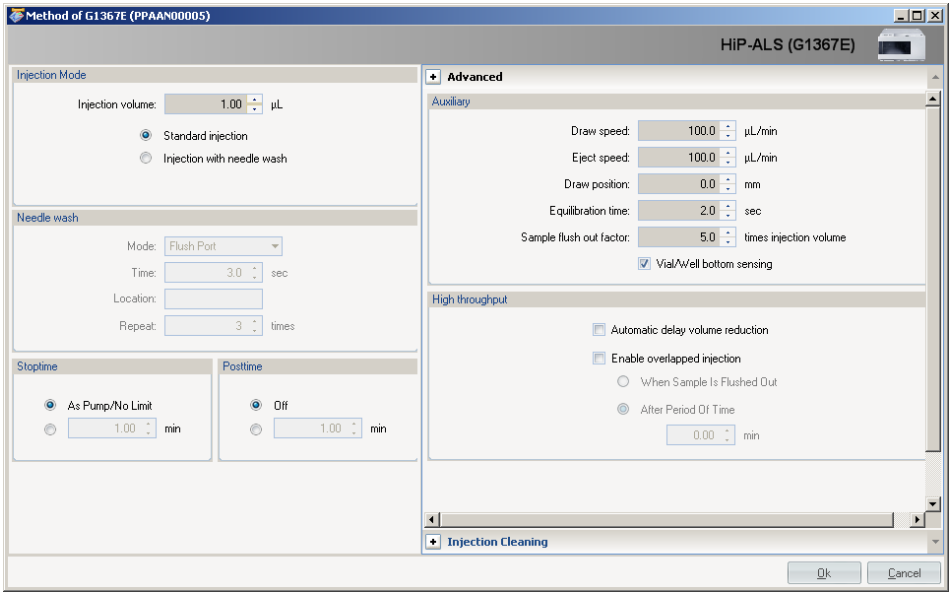


Figure 25 Écran de configuration de méthode, onglet Échantillonneur automatique haute performance

- **Injection Mode**
  - **Injection volume** : règle le volume à injecter (par exemple 1 µl),
  - **Standard injection** : indique qu'aucun lavage de l'extérieur de l'aiguille n'est effectué,
  - **Injection with needle wash** : permet de réduire les transferts éventuels. Il s'agit du mode de fonctionnement recommandé ; il est configuré dans la zone en dessous.
- **Needle Wash** (si l'option est sélectionnée au-dessus).
  - **Mode** : indique comment l'extérieur de l'aiguille est rincé, soit activement au moyen de la **Flush Port**, soit par immersion dans un **Wash Vial** déterminé.
  - **Time** : durée en secondes de pompage du solvant de lavage par la pompe péristaltique reliée à la voie de lavage. La pompe fonctionne pendant 15 s supplémentaires pour rincer la voie de lavage.

- **Location** : indique quel flacon ou puits de plaque est utilisé dans le cas où l'option **Wash Vial** est sélectionnée.

REMARQUE Les flacons ne doivent pas comporter de membrane ; ils doivent être ouverts afin d'éviter toute transmission de matériel par transfert sur la membrane.

- **Repeat** : indique, si l'option Flacon de lavage est sélectionnée, comment de fois l'aiguille est immergée dans le flacon (par défaut 3 fois, maximum 5).

- **Stop Time / Post Time** sont réglés sur **No Limit / Off**. Ces paramètres sont définis dans l'onglet de la pompe.
- **Advanced - Auxiliary**
  - **Draw speed** : indique la vitesse d'aspiration de l'échantillon à travers l'aiguille. La valeur par défaut est 100 µl/min. La vitesse doit être diminuée pour des échantillons visqueux ou pour une plus grande précision avec des petits volumes d'échantillon (<2 µL).
  - **Eject speed** : indique la vitesse de sortie de l'aiguille.
  - **Draw position** : indique le décalage vertical par rapport à la position d'injection nominale de 10 mm au-dessus du fond d'un flacon. Pour un flacon de 2 ml, cela correspond à environ la moitié de la hauteur du flacon donc un décalage négatif permet de prélever l'échantillon plus près du fond du flacon. Par exemple, un décalage de -7 mm positionne l'extrémité de l'aiguille à 3 mm au-dessus du fond du flacon.
  - **Equilibration time** : indique l'intervalle de temps entre l'aspiration de l'échantillon et le déplacement de l'aiguille.
  - **Sample flush out factor** : correspond au temps d'attente de l'échantillonneur automatique après l'injection et avant de permettre à la valve de revenir à la position de dérivation. Cela garantit que l'échantillon a été évacué de l'aiguille, du siège et de la vanne d'injection. La valeur par défaut est 5.
  - **Vial/Well bottom sensing** : représente une alternative à l'utilisation du décalage de la position d'aspiration. L'aiguille se déplace lentement jusqu'à toucher le fond du flacon ou du puits, puis remonte de 1 mm. Il s'agit d'un moyen ingénieux de s'assurer que l'aiguille est proche du fond du flacon mais par conséquent l'injection est légèrement plus longue. Cette option ne doit pas être utilisée s'il existe des particules au fond du flacon qui pourraient obstruer l'aiguille.

- **Advanced - High Throughput**
  - **Automatic delay volume reduction** (ADVR) : bascule la vanne d'injection de la voie principale vers la voie de dérivation après l'injection et qu'un volume défini par le facteur de rinçage de l'échantillon ait été pompé à travers l'injecteur. Cela réduit le volume de retard du système d'environ 70 µl et permet aux variations de gradient d'atteindre la colonne plus rapidement.
  - **Enable overlapped injection** : bascule la vanne d'injection de la voie principale vers la voie de dérivation après l'injection et soit après que l'échantillon ait été évacué de l'injecteur, soit plus tardivement pendant l'analyse après un intervalle de temps défini. L'injecteur aspire ensuite l'échantillon suivant de façon à être prêt pour l'injection suivante, réduisant ainsi la durée totale de cycle et augmentant la capacité d'analyse d'échantillons.
- **Injection Valve Cleaning**
  - **Injector Cleaning** : permet de rincer le système d'injection avec du solvant.
  - **Injection Valve Cleaning** : permet de basculer la voie de la vanne à des points donnés pendant l'analyse afin de minimiser le transfert lorsque des composés pouvant poser un problème sont injectés.

Onglet Échantillonneur automatique haute performance (Programme d'injection du HiP-ALS)

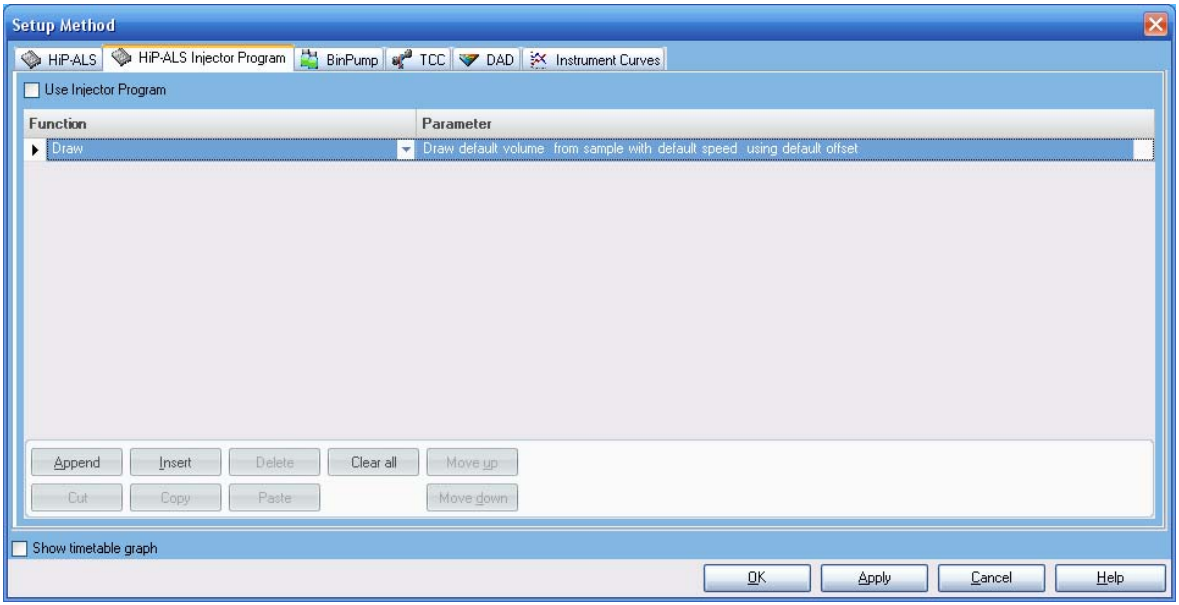


Figure 26 Écran de configuration de méthode – onglet Programme d'injection de l'échantillonneur automatique HiP

Cet onglet permet de créer des programmes d'injection spécifiques comprenant la manipulation d'aliquots à partir de flacons multiples, comme par exemple lors de la dérivatisation pré-colonne. Des réactifs chimiques sont alors mélangés automatiquement avec l'échantillon pour améliorer sa détection ou la sensibilité. Un exemple courant est la dérivatisation d'acides aminés avec les réactifs OPA et FMOC. Pour de plus amples informations, consultez le *manuel de l'échantillonneur automatique haute performance Agilent 1260 Infinity*.

Onglet Pompe binaire

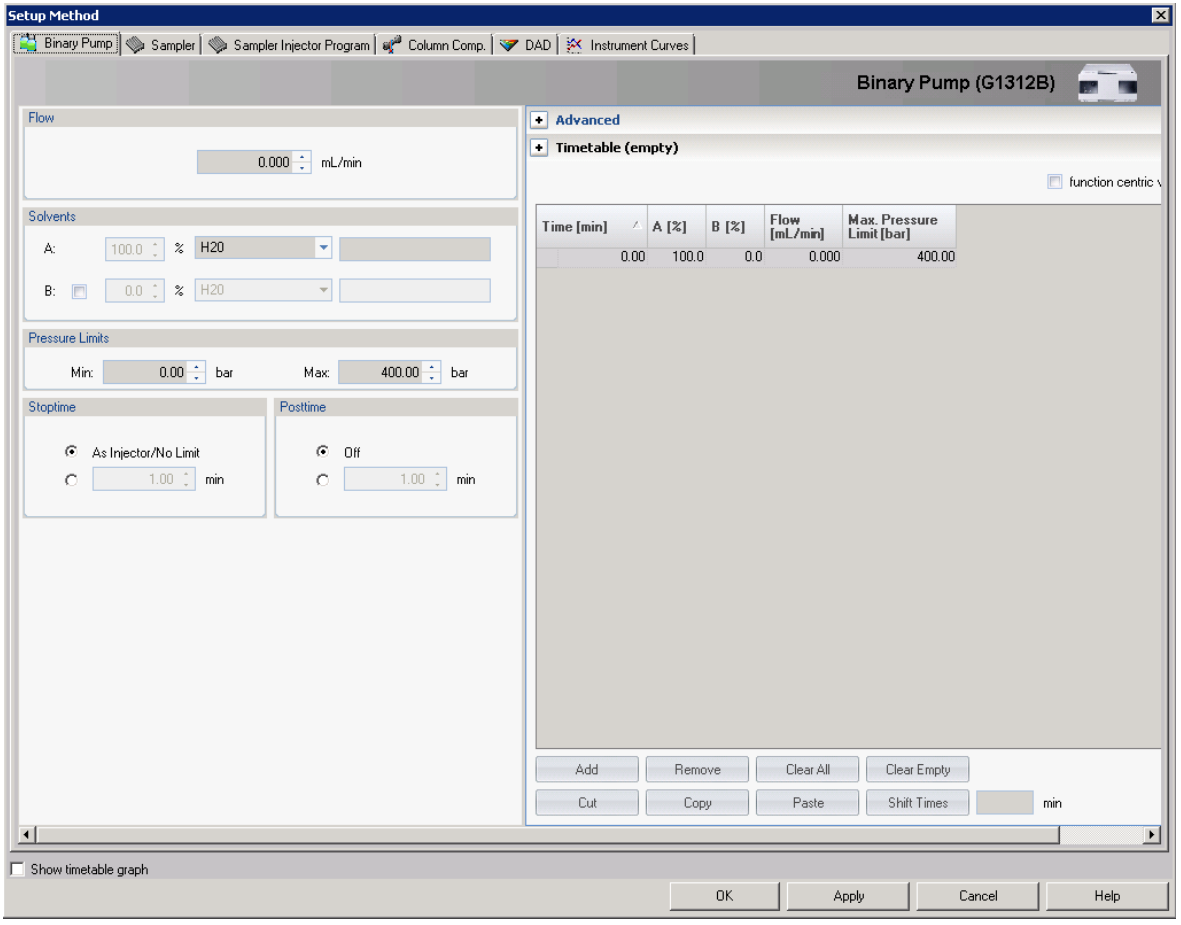


Figure 27 Écran de configuration de méthode – onglet Pompe binaire

- **Flow** : permet de régler un débit de jusqu'à 5 mL/min. Pour l'exemple de séparation, un débit de 4 mL/min est utilisé. Si la contrepression atteint brièvement le paramètre de pression maximum, le débit est réduit pendant quelques secondes pour diminuer la pression. Si la pression continue d'être limitée de cette manière, une situation d'erreur est générée et le débit est arrêté.

- **Solvents** : indique les phases mobiles disponibles et la composition en pourcentage du mélange pompé dans les deux voies, A et B. Pour chaque voie un menu déroulant permet de sélectionner un solvant dans la liste pour optimiser les paramètres de compressibilité utilisés par la commande de pompe. Cela permet d'optimiser la circulation des liquides comme décrit dans la section « Configuration optimale de l'instrument pour les colonnes de d.i. 2,1 mm », page 43. Une deuxième zone de texte permet de saisir une description de la phase mobile. Si une vanne de sélection de solvant est installée sur la pompe, il existe deux possibilités de solvant pour chaque voie, l'option appropriée pour la méthode est sélectionnée à l'aide du bouton radio à gauche de la description du solvant. La pompe génère des mélanges binaires à partir des voies A et B sélectionnées, par exemple A2 et B1 ; il n'est pas possible de mélanger A1 et A2 ou B1 et B2. Les valeurs indiquées pour les pourcentages de A et de B définissent la composition d'une méthode isocratique ou les conditions de départ d'une méthode à gradient et les conditions d'équilibrage entre deux analyses à gradient. Seule la valeur de B est saisie, la valeur de A est actualisée pour afficher 100 % moins B dès que le curseur est déplacé. Pour l'exemple de séparation, réglez A sur Eau et B sur acétonitrile à 60 %. A sera de 40 %.
- **Timetable** : décrit les variations de la composition de A et de B en pourcentage dans la phase mobile au cours de l'analyse, et le cas échéant les variations du débit et la pression maximum autorisée. Le tableau des événements permet de faire varier de manière linéaire les paramètres entre des points de consigne déterminés. Les valeurs des paramètres définies ailleurs sur cet écran sont utilisées comme conditions de départ et sont modifiées par la suite seulement si des valeurs sont entrées dans le tableau des événements. Par exemple, si le débit doit rester constant durant une analyse alors il n'est pas nécessaire de entrer des valeurs de débit dans le tableau des événements. Pour entrer des valeurs dans le tableau des événements, cliquez sur le bouton **Add** pour ajouter une ligne au tableau ; entrez le temps du point de consigne, sélectionnez le type d'entrée dans la liste déroulante (composition, débit, pression) et cliquez sur la zone **Parameter** pour afficher le champ de saisie de la valeur. Si les entrées du tableau ne sont pas saisies par ordre chronologique, elles sont triées automatiquement en fonction du temps. Les lignes du tableau des événements peuvent être modifiées directement et les boutons **Cut**, **Paste** et **Remove** peuvent être utilisés pour ajouter et supprimer des lignes. Plusieurs lignes peuvent être ajoutées pour créer une série de segments de gradient linéaires et définir le profil de gradient souhaité. Pour configurer un gradient simple, effacez d'abord tout le contenu du tableau à l'aide du bouton **Clear all** si celui-ci contient des entrées, puis ajoutez une ligne et entrez le temps et la composi-

tion du solvant requis. Si vous souhaitez utiliser un gradient par paliers, effectuez deux entrées avec les paramètres « avant palier » et « après palier » séparés par 0,01 min. Ce type de gradient est souvent utilisé pour éluer rapidement des pics à rétention longue de la colonne vers la fin de l'analyse en augmentant le solvant plus fort et/ou le débit à l'aide d'un palier. Par exemple, le % de B peut être augmenté de 75 % à 95 %. Il n'est pas nécessaire d'entrer les valeurs des paramètres pour le temps 0,00 min dans le tableau des événements, ces valeurs sont récupérées des autres points de consigne de l'écran. Toutefois, certains utilisateurs aiment voir l'ensemble du tableau des événements et entrent les valeurs pour le temps 0,00 min. Cela ne pose pas de problème mais il est à noter que si les conditions initiales sont modifiées par la suite les nouvelles valeurs doivent être entrées dans le tableau des événements et les points de consigne modifiés dans la zone **Solvents** de l'écran.

- **Show timetable graph** : affiche une version graphique de la variation des paramètres dans le temps si la case est cochée.
- **Stop Time** : indique la durée totale pour la séparation ou l'analyse. Appelé parfois « Durée d'analyse » par certains utilisateurs. Il s'agit de la durée (mesurée en minutes à partir de l'injection) de l'analyse. Lorsque cette durée est écoulée l'acquisition de données s'arrête et le débit, la composition et les autres paramètres du système reviennent à leurs valeurs initiales pour la méthode. Le système devient de nouveau disponible pour l'injection suivante. Le temps d'arrêt doit toujours être au moins aussi long que la dernière entrée du tableau des événements, car si ce n'est pas le cas l'analyse s'arrête et le système revient aux conditions initiales avant que l'ensemble des événements aient pu être effectué. Le **Stop Time** peut être réglé sur **No Limit**, dans ce cas l'utilisateur doit terminer manuellement l'analyse. Même si des **Stop Time** peuvent être configurés pour tous les modules du système, le **Stop Time** de la pompe sert de référence et celui des autres modules est généralement réglé sur cette valeur.
- **Post Time** : définit la durée d'un compte à rebours à la fin de l'analyse pendant laquelle l'injection suivante ne peut être effectuée. Cela permet au système de se rééquilibrer après une analyse à gradient. Pour une méthode isocratique ce paramètre peut être réglé sur **Off**. Pour des méthodes à gradient cette valeur peut être déterminée expérimentalement en observant le comportement de la ligne de base. Généralement, il correspond au temps nécessaire pour rincer le système avec le volume de retard du système plus au moins trois à cinq volumes de colonne.
- **Pressure Limits** : permettent de contrôler le comportement de la pompe en fonction de la pression. La pression maximale de la pompe binaire 1260

Infinity est de 600 bar mais certaines colonnes ne résistent pas à ce niveau de pression et il est nécessaire de les protéger en fixant une limite de pression. La pompe génère une situation d'erreur si cette pression est dépassée. Toute analyse en cours est arrêtée et la pompe passe en mode veille sans débit. Les informations relatives à la pression maximum supportée par chaque colonne sont fournies avec la colonne. Les colonnes Agilent ZORBAX RRHT peuvent être utilisées à 600 bar. La limite de pression inférieure est « Désactivée » si sa valeur est de zéro mais pour toute autre valeur une situation d'erreur sera générée par la pompe si la pression de fonctionnement descend en dessous de ce seuil. Ce paramètre correspond à une mesure préventive lorsque la colonne ne se trouve pas à l'intérieur d'un module équipé d'un capteur de fuites ou dans le cas où le système serait asséché. Habituellement cette valeur est réglée entre 10 et 20 bar pour la limite de pression minimum.

Onglet du compartiment à colonne thermostaté (TCC)

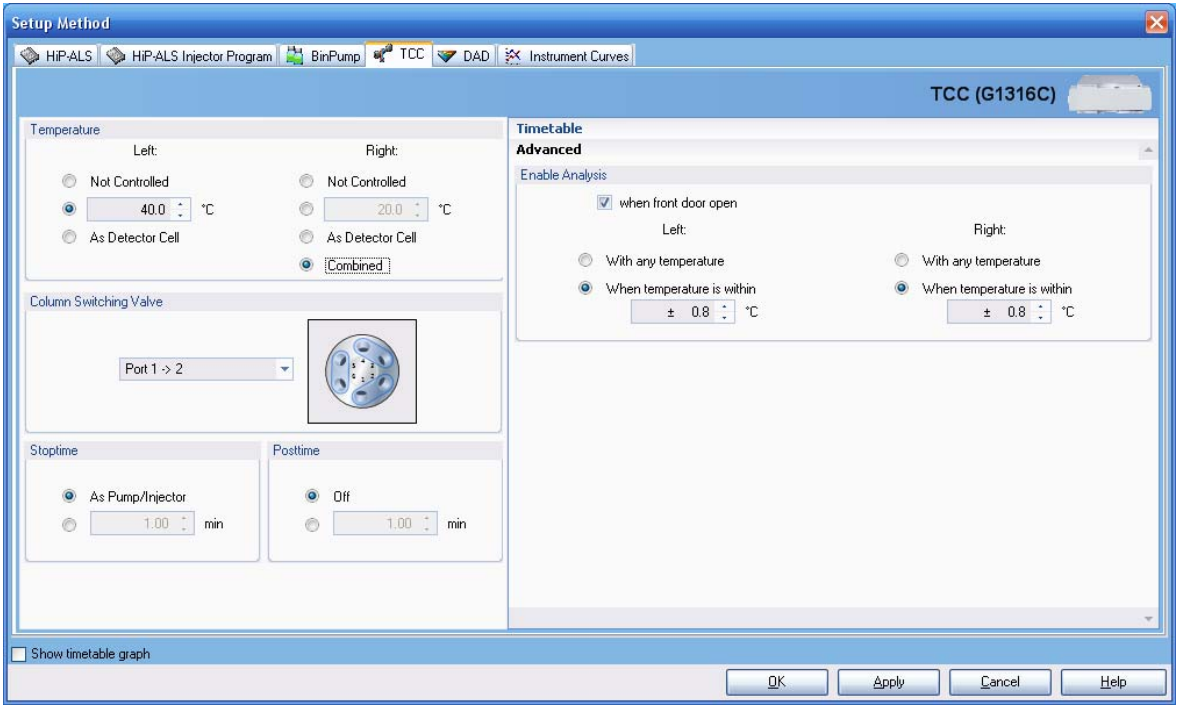


Figure 28 Écran de configuration de méthode écran – onglet Compartiment à colonne thermostaté

- **Temperature** : permet de définir la température des supports de colonne des côtés gauche et droit. Les températures peuvent être régulées de manière indépendante ou associées en activant le bouton radio **Combined**. Lorsque combinées, les valeurs entrées pour le côté gauche s'appliquent aux deux côtés ; cela est nécessairement le cas si la longueur de la colonne dépasse 15 cm et que celle-ci doit être fixée des deux côtés du compartiment. Les deux côtés peuvent fonctionner indépendamment lorsque deux colonnes sont utilisées à des températures différentes ; ceci peut être mise en œuvre lorsqu'une vanne de d'inversion entre colonnes a été installée pour basculer le flux d'une colonne à l'autre. Un autre cas de figure où les zones de température séparées sont utiles se présente lorsque d'un côté la colonne est utilisée à une température élevée (p. ex. au-dessus de 60 °C) et de l'autre côté l'échangeur de chaleur est utilisé pour refroidir l'éluant avant que celui-ci pénètre dans le détecteur, réduisant ainsi le bruit de fond dû à des

effets thermiques dans la cuve à circulation. La sélection de l'option **As Detector Cell** permet de régler automatiquement la valeur de la température sur celle définie pour la cuve du détecteur.

La température de chaque zone peut être réglée sur une valeur comprise entre -5 °C et 100 °C ; l'utilisateur doit vérifier que la colonne convient à une utilisation à cette température. (Les phases solides Agilent ZORBAX RRHT StableBond peuvent être utilisées dans la fourchette haute de la plage). La température est régulée à une précision de ± 0,15 °C jusqu'à 10 °C en dessous de la température ambiante, bien qu'il soit à noter que très peu d'applications fonctionnent en dessous de 12 - 15 °C. Évitez d'utiliser le TCC à une température tellement basse que l'humidité de l'air se condense car cela pourrait déclencher le capteur de fuites.

- **Column Switching Valve** : cette option n'est active que si une vanne est installée entre les supports de colonne. Trois types de vanne sont disponibles :
  - 2 positions / 6 voies : pour permuter entre deux colonnes,
  - 2 positions / 10 voies : pour alterner avec la régénération des colonnes,
  - 8 positions / 9 voies : utilisée pour la sélection de colonnes multiples avec MDS.

Onglet Détecteur à barrette de diodes

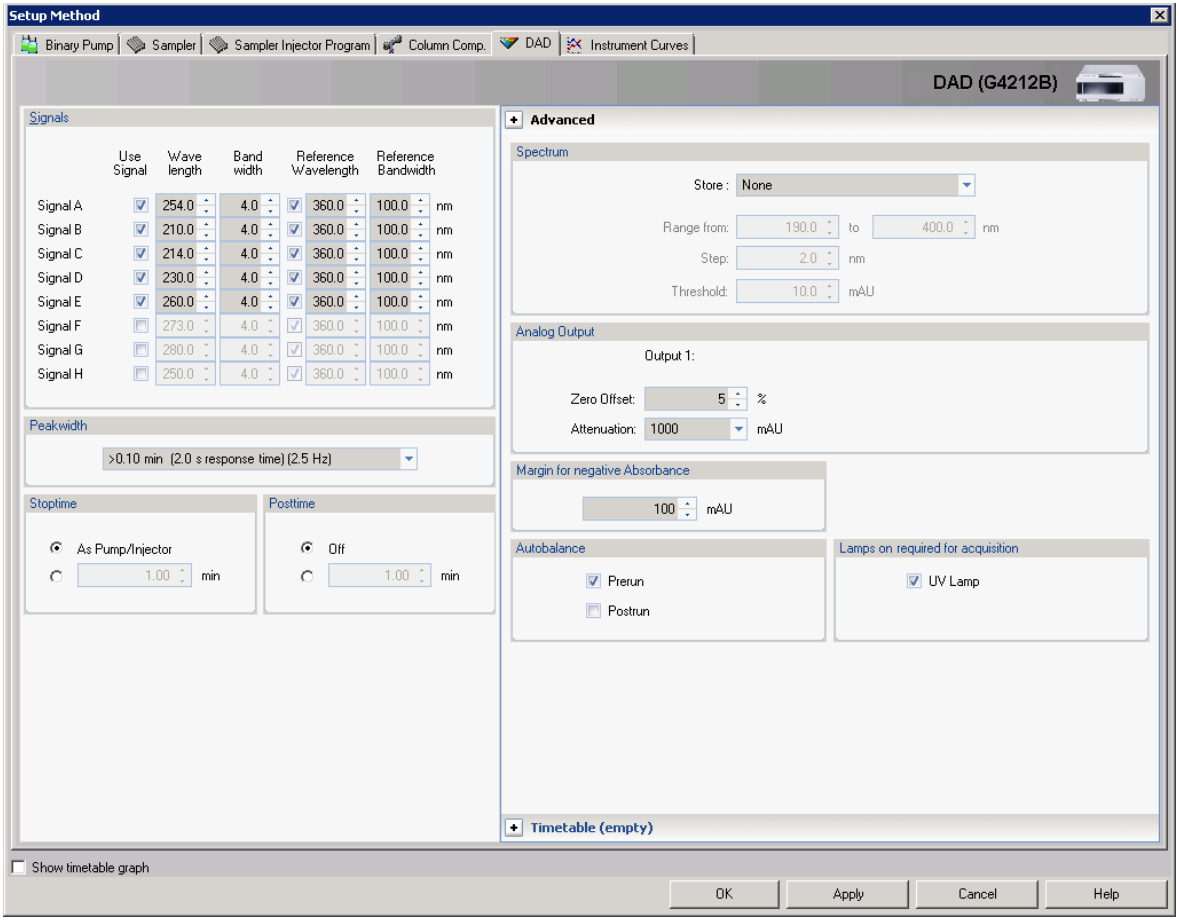


Figure 29 Écran de configuration de méthode : onglet Détecteur à barrette de diodes

- **Signals** : Jusqu'à huit signaux distincts (chromatogrammes) peuvent être enregistrés. Pour indiquer qu'un signal doit être enregistré, cochez la case **Use Signal** correspondant au signal et définissez la longueur d'onde et la bande passante. Le cas échéant, un signal de référence doit être défini et sa case cochée.
  - **Wavelength** : indique la longueur d'onde centrale (nm) du signal,
  - **Bandwidth** : indique la largeur (nm) du signal,

  - **Reference Wavelength** : indique la longueur d'onde centrale (nm) de la bande de référence qui est soustraite du signal analytique,
  - **Reference Bandwidth** : indique la largeur (nm) de la bande de référence.
- **Peakwidth** : indique la vitesse d'acquisition des données et le filtrage du signal.
- Les **Stoptime** / **Posttime** sont définis sur **As Pump/Injector** et **Off** et ces valeurs sont généralement gérées dans l'onglet **Pump**. Cependant, un temps d'analyse du détecteur différent du temps d'analyse de la pompe peut être configuré s'il est nécessaire d'arrêter le traitement des données avant la fin de l'analyse définie dans la pompe. Cela peut être le cas lorsqu'une rampe d'équilibrage du gradient a été définie à la fin du gradient. Par exemple, si le pourcentage de B est de 95 % à 10 min et qu'il est attendu que tous les pics aient été élués de la colonne, alors l'analyse peut globalement être considérée comme étant finie, mais un segment de gradient supplémentaire peut être ajouté pour redescendre le pourcentage de B à sa valeur initiale sur une période de deux minutes et rééquilibrer en douceur la colonne. Comme aucune donnée utile n'est attendue pendant cette descente, le temps d'analyse du détecteur peut être réglé sur 10 min pour que l'acquisition des données s'arrête, alors que le temps d'analyse de la pompe est de 12 min pour permettre la réalisation de la descente. Il s'agit d'une préférence de l'utilisateur, certaines personnes reconnaissent que les dernières minutes du chromatogramme ne contiennent pas de données utiles mais les enregistrent quand même pour éviter l'inconvénient de devoir définir un temps d'analyse différent pour le détecteur. Le temps d'analyse du détecteur n'a aucun effet sur celui de la pompe et le fait qu'il soit plus court ne raccourcit pas l'analyse (comme cela serait le cas avec les temps d'analyse des autre modules). Le plus facile est donc de régler tous les temps d'analyse sur **As Pump/Injector**.
- Le **Timetable** fonctionne de la même manière que les autres modules : ajoutez une ligne, sélectionnez la fonction à modifier et entrez les nouvelles valeurs de cette fonction. Toute variation des paramètres du détecteur s'applique immédiatement au temps défini. Les paramètres suivants peuvent varier au cours d'une analyse :
  - **Balance**
  - **Change Signal**
  - **Change Threshold**
  - **Change Peak –detector Peakwidth**
  - **Change Spectra Acquisition Mode**

- **Change Contacts**

- **Advanced - Spectrum**

  Les spectres peuvent être enregistrés durant l'analyse de manière continue ou en fonction des pics (cela est vrai pour le logiciel ChemStation ; certains autres logiciels, p. ex. EZChrom, ne prennent en charge que l'acquisition continue de tous les spectres et les options d'enregistrement en fonction des pics n'apparaissent pas). L'acquisition des spectres et l'acquisition des signaux sont des opérations indépendantes exécutées par le micrologiciel du détecteur ; elles ne dépendent pas de l'extraction des données de la matrice des données 3D par le logiciel de l'ordinateur. La vitesse d'acquisition des spectres est déterminée par le paramètre **Peakwidth** et huit spectres sont acquis pendant la durée indiquée sous **Peakwidth**. Le micrologiciel effectue une détection de pics sur le signal A uniquement afin de déterminer quels spectres de pic doivent être enregistrés. Pour des signaux multiples, il peut être nécessaire de régler le signal A comme détecteur à large bande pour s'assurer que des spectres de pic sont disponibles pour tous les signaux de longueurs d'onde différentes.

  - **Store** : permet de choisir le mode d'acquisition des spectres. Les options sont :

    None : aucun spectre n'est enregistré,

    Apex+Baselines : trois spectres sont enregistrés au début, au sommet et à la fin du pic,

    Apex+Slopes+Baselines : cinq spectres sont enregistrés au début, dans la pente ascendante, au sommet, dans la pente descendante et à la fin du pic,

    All in Peak : tous les spectres disponibles à l'intérieur d'un pic sont enregistrés,

    All : tous les spectres sont enregistrés tout au long de l'analyse,

    Every 2nd Spectrum : enregistre seulement un spectre sur deux tout au long de l'analyse.

  - **Range** : les spectres peuvent être enregistrés sur l'ensemble de la plage du détecteur, de 190 nm à 640 nm, ou sur une plage réduite définie par l'utilisateur. (Cela réduit aussi le volume de données à enregistrer).

  - **Step** : permet de définir l'intervalle (nm) des données enregistrées dans un spectre et détermine donc la résolution du spectre observé. La valeur par défaut de 2 nm est un bon choix pour la plupart des applications.

  - **Threshold** : définit la valeur seuil de hauteur de pic (mDO) au-dessus de laquelle les spectres sont enregistrés.

- **Advanced - Analog Output**

  Le DAD 1260 Infinity dispose d'un connecteur de sortie de signal analogique pour utilisation avec des systèmes de données qui n'acceptent pas une entrée numérique. Les options sont :

  - **Zero Offset** : définit le niveau zéro sur un pourcentage fixe du signal de sortie. Cela permet une certaine marge pour la dérive négative.
  - **Attenuation** : règle l'échelle de la sortie sur l'absorbance définie.

- **Advanced - Margin for Negative Absorbance**

  La valeur par défaut est de 100 mAU, ce qui signifie que la plage dynamique du détecteur est suffisante, au vu du niveau sur lequel a été réglé le zéro, pour mesurer jusqu'à cette limite inférieure. Pour mesurer des pics négatifs plus importants ou pour suivre une ligne de base présentant une forte dérive négative, cette valeur doit être ajustée vers le bas pour éviter l'obtention d'un signal plat sur la limite inférieure de la plage. Toutefois, cette valeur ne doit pas être modifiée sans bonne raison, car sa diminution augmente le bruit de la ligne de base et réduit la plage disponible pour la mesure des pics positifs.

- **Advanced - Autobalance** : règle le niveau d'absorbance sur zéro pour toutes les longueurs d'onde (c.-à-d. tous les points du spectre sont stabilisés sur zéro), le signal de la ligne de base est donc également réglé sur zéro. L'option **Prerun** est sélectionnée pour stabiliser avant le début de l'analyse ; il s'agit du choix habituel dans des situations normales. Parfois l'option **Postrun** peut être sélectionnée pour équilibrer à la fin de l'analyse après écoulement du Temps postanalyse. Par exemple, si le signal présente toujours une dérive négative et que l'utilisateur souhaite finir l'analyse avec une absorbance sur zéro, cette option permet de ramener l'absorbance sur le niveau zéro pour l'analyse suivante. Cela ne modifie pas rétrospectivement l'analyse à la fin de laquelle la stabilisation est exécutée.

- **Advanced - Lamps on required for acquisition** : le DAD 1260 Infinity dispose d'une lampe UV qui doit être allumée pour l'analyse ; cette case doit donc être cochée.

Onglet Instrument Curves

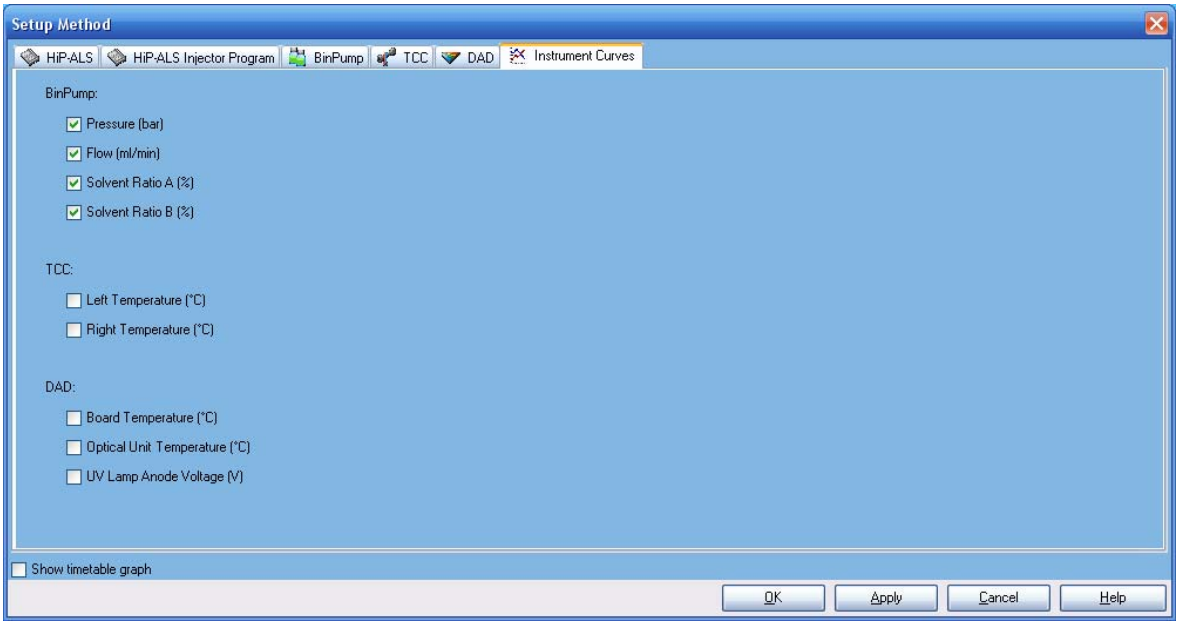


Figure 30 Écran de configuration de méthode – Onglet Courbes de l'instrument

L'onglet Courbes de l'instrument permet de suivre les flux de données autres que les signaux du détecteur. Leur enregistrement avec les données est activé en cochant les cases appropriées. Ces courbes servent essentiellement à des fins de diagnostic. Les courbes possibles sont :

- Pompe :
  - Pression
  - Débit
  - Composition A/B : peut se révéler utile pour superposer le profil du gradient sur un chromatogramme.
- Compartiment à colonne thermostaté :
  - Température gauche/droite
- Détecteur :
  - Température de la carte
  - Température de l'unité optique
  - Tension de l’anode de la lampe UV

Traitement des données

Détails des signaux

Vous pouvez également accéder directement à l'écran **Signal Details** par l'intermédiaire de la vue **Method and Run Control** : effectuez un clic droit sur l'icône **Calibration** de l'interface utilisateur, puis sélectionnez **Signal Details** dans le menu contextuel. Dans la vue Analyse des données, vous pouvez accéder à cet écran par l'intermédiaire du menu **Calibration > Signal Details**.

L'écran **Signal Details** est l'étape suivante de la fonction **Edit Entire Method** et il permet d'identifier les signaux acquis qui doivent être traités par l'Analyse des données. La liste déroulante énumère les signaux disponibles, y compris les signaux analytiques définis dans les paramètres du détecteur, et des paramètres enregistrés tels que la température, le débit, la composition, la pression et les tracés diagnostiques. Sélectionnez un signal et cliquez sur **Add to Method** pour l'envoyer vers le tableau **Signal Details** affiché dans la partie inférieure de l'écran. Vous pouvez sélectionner un, plusieurs ou tous les signaux acquis par le détecteur. Si aucun signal n'est sélectionné, le tableau est vide ; dans ce cas de figure, le logiciel ChemStation traite par défaut tous les signaux acquis par le détecteur.

Parfois l'utilisateur modifie une méthode existante pour créer une nouvelle méthode et se trouve confronté à une erreur de **Parameter Mismatch** lorsqu'il essaie de lancer la méthode. L'origine de cette erreur vient d'un signal défini dans **Signal Details**, par exemple 250 nm avec une largeur de bande de 8 nm, alors que dans la nouvelle méthode ces valeurs ont été réglées sur 254 nm/12 nm par exemple. Le tableau **Signal Details** contient toujours les informations initiales et le système cherche à traiter un signal qui n'est plus acquis. Pour corriger cette erreur, il suffit de sélectionner l'ancien signal dans le tableau et de le supprimer à l'aide du bouton **Delete Row**.

Si plusieurs détecteurs sont utilisés sur un même système, comme par exemple un détecteur à barrette de diodes et un spectromètre de masse, les lignes **Signal Description** permettent d'entrer un délai de temporisation pour le détecteur aval pour que le logiciel puisse aligner les pics des différents détecteurs.

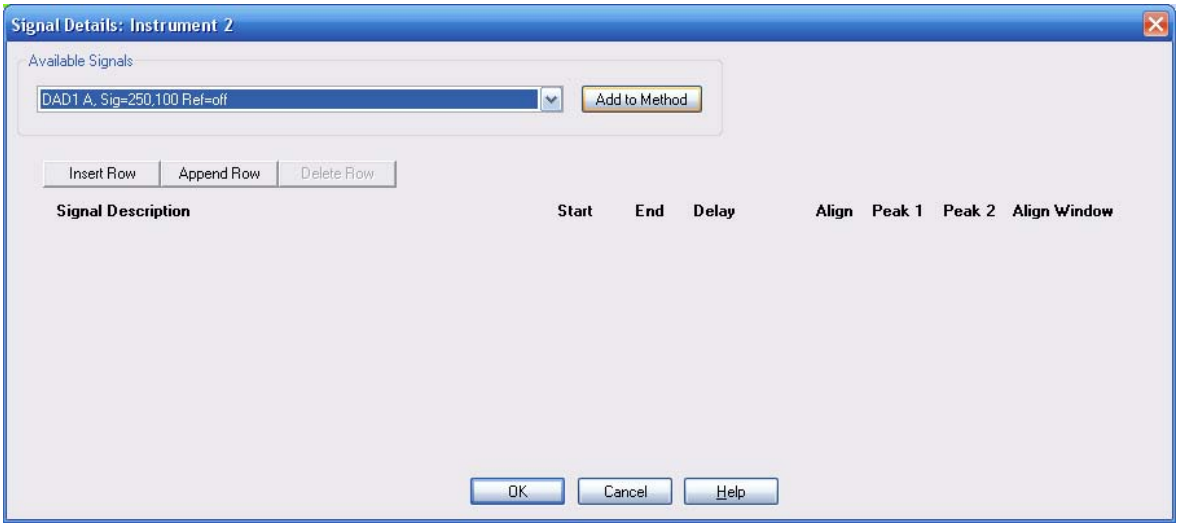


Figure 31 Détails des signaux

Modification des événements d'intégration

Vous pouvez accéder directement à l'écran **Edit Integration Events** par l'intermédiaire de la vue **Method and Run Control** en effectuant un clic droit sur l'icône Événements d'intégration de l'interface utilisateur puis en cliquant sur **Edit Integration Events** dans le menu contextuel. Vous pouvez également accéder à cet écran dans la vue **Data Analysis** par l'intermédiaire du menu **Integration > Integration Events...** ou l'icône de la tâche **Edit Integration Events**.

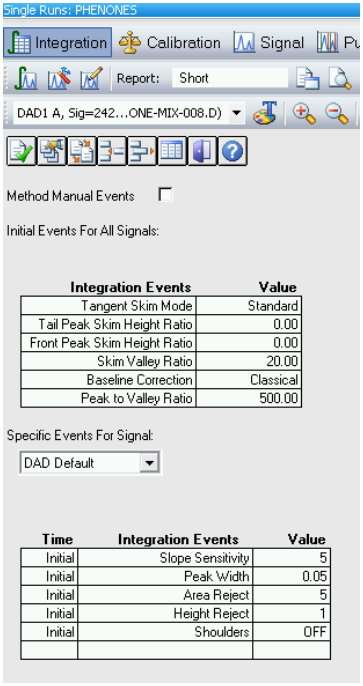


Figure 32 Écran Modification des événements d'intégration

L'intégration, l'étalonnage et la création de rapports constituent la partie d'analyse des données de la méthode. Les paramètres d'intégration et le tableau d'étalonnage sont plus faciles à configurer une fois que les données ont été acquises et peuvent être examinées dans la vue Analyse des données. Les événements d'intégration peuvent être optimisés à ce moment-là et les réglages par défaut sont souvent utilisés pour les premières acquisitions.

L'écran **Edit Integration Events** comprend deux tableaux :

- le tableau **Initial Events For All Signals** contient les événements (paramètres d'intégration) qui s'appliquent à tous les signaux acquis avec la méthode,
- le tableau **Specific Events For Signal** contient les événements qui s'appliquent à un type de détecteur ou à des signaux différents d'un même détecteur.

  Les paramètres principaux de ce tableau sont :

  - **Slope Sensitivity** : indique la pente et la courbure de la ligne de base qui définissent le début et la fin d'un pic ;
  - **Peak Width** : il faut saisir la largeur à mi-hauteur du pic d'intérêt le plus étroit. Cela aide l'intégrateur à distinguer entre le bruit et des pics très petits ;
  - **Area Reject / Height Reject** : valeurs seuil déterminant l'aire et la hauteur minimales nécessaire pour inclure un pic dans les résultats ;
  - **Integration OFF/ON** : annule l'intégration entre des limites définies. Fonction presque toujours utilisée pour empêcher l'intégration de la région entre l'injection et le front de solvant ou le pic du marqueur non retenu.

Les lignes comme **Integration OFF/ON** sont ajoutées au tableau à l'aide des icônes en haut de la fenêtre.

Cliquez sur **OK** pour quitter et ouvrir l'écran suivant du processus Modifier l'ensemble de la méthode.

Définition du rapport

Vous pouvez accéder directement à l'écran **Specify Report** par l'intermédiaire de la vue **Method and Run Control** en effectuant un clic droit sur l'icône Événements d'intégration de l'interface utilisateur puis en cliquant sur **Specify Report** dans le menu contextuel. Vous pouvez également accéder à cet écran dans la vue **Data Analysis** par l'intermédiaire du menu **Report > Specify Report** ou l'icône de la tâche Définition du rapport.

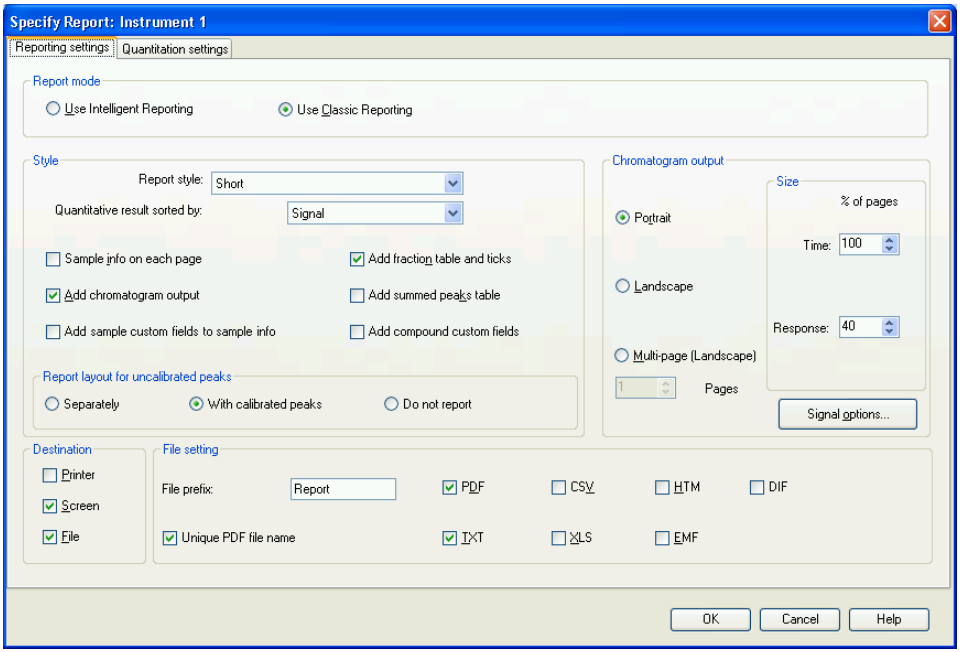


Figure 33 Écran Définition du rapport

Pour obtenir un rapport simple avec les pourcentages des aires avec le mode Rapport classique, qui permet d'envoyer le rapport à l'imprimante et de créer un fichier PDF, entrez les paramètres suivants dans les différentes sections de l'écran Définition du rapport :

Dans l'onglet **Reporting settings** :

- **Report mode**: Utilisez le mode Rapport classique
- **Style**
  - **Report Style**: Court

  - **Quantitative results sorted by**: Signal
  - **Add Chromatogram Output**: Coché
- **Chromatogram Output**: Portrait
- **Size**:
  - Axe **Time** : 100 % de la page
  - Axe **Response** : 40 % de la page
- **Destination**
  - **Printer** : Coché
  - **Screen** : Décoché
  - **File**: Coché
- **File Setting**:
  - **PDF**: Coché
  - **Unique PDF file name**: Coché

Dans l'onglet **Quantitation settings** :

- **Calculation mode**
  - **Calculate**: Pourcentages
  - **Based on**: Aire

Cliquez sur **OK** pour quitter et ouvrir l'écran suivant du processus Modifier l'ensemble de la méthode.

Courbes de l'instrument

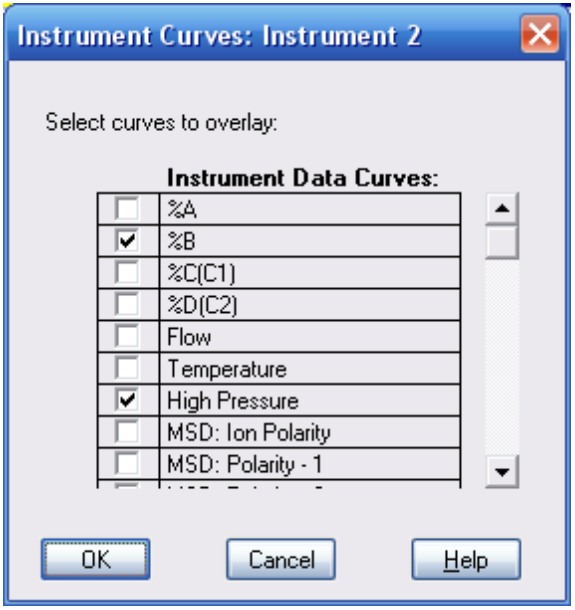


Figure 34 Écran Courbes de l'instrument

Les cases à cocher **Instrument Curves** permettent de superposer ces paramètres enregistrés sous la forme d'un graphique sur le chromatogramme.

Liste de contrôle de l'exécution

Vous pouvez accédez directement à la **Run Time Checklist** par l'intermédiaire du menu **Method > Run Time Checklist...** ou en cliquant sur l'icône **Run Time Checklist** en haut à droite de l'écran.

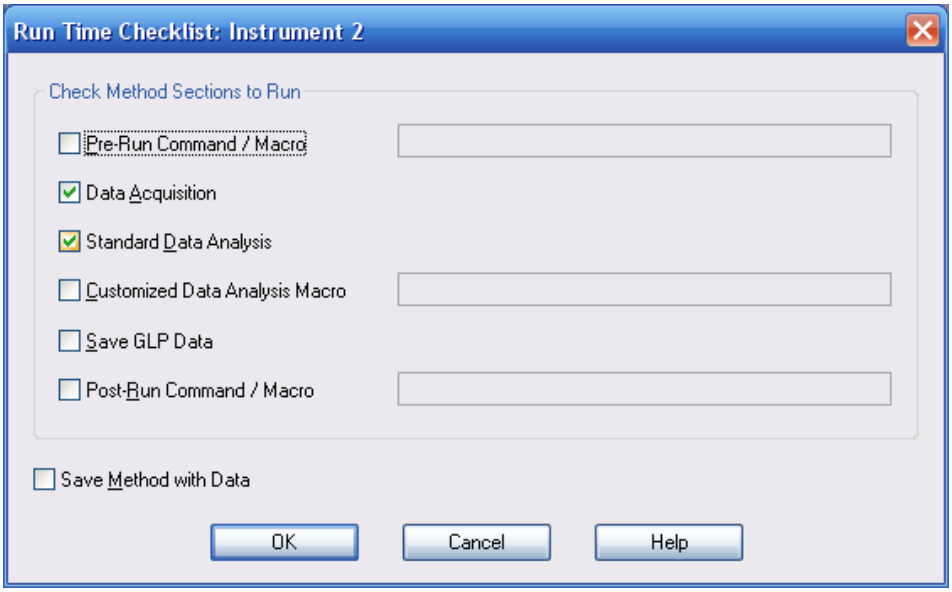


Figure 35 Écran Liste de contrôle de l'exécution

La **Run Time Checklist** permet de choisir si la méthode doit effectuer à la fois l'acquisition de données et l'analyse des données. Elle permet également d'incorporer des macros ou des programmes à différents points pendant la procédure opérationnelle. Dans la plupart des cas les cases **Data Acquisition** et **Standard Data Analysis** sont cochées. Si aucune analyse des données n'est nécessaire, par exemple lors d'une série d'analyses pour le développement d'une méthode, la case **Standard Data Analysis** peut être décochée afin de ne pas créer de rapport, les données pourront être évaluées par la suite dans la vue **Data Analysis**.

Pour lier un macro à un des points d'accès, il faut cocher la case appropriée et saisir le nom du macro dans la zone de texte à droite. Le logiciel cherche le macro dans le répertoire C:\Chem32\Core ; il faut donc inclure le chemin d'accès s'il est localisé dans un autre répertoire.

Les points d'accès dans la procédure opérationnelle de la méthode sont :

- **Pre-Run Command / Macro**
- **Customized Data Analysis Macro**
- **Post-Run Command / Macro**

Save Method with Data permet d'enregistrer une copie de la méthode dans le fichier de données sous le nom RUN.M. Avec la configuration habituelle du logiciel ChemStation, il n'est pas nécessaire d'utiliser cette option car ce dernier enregistre systématiquement la méthode dans le fichier de données (toutes les versions supérieures à B.02.01). Cette option n'est utile que si le logiciel ChemStation a été configuré pour que l'option **Unique Sequence Folder Creation** soit désactivée, dans ce cas de figure les méthodes ne sont pas enregistrées systématiquement dans le fichier de données.

Puisque cet écran est le dernier du processus, en cliquant sur **OK** vous quitterez en même temps la **Run Time Checklist** et le processus **Edit Entire Method**. Vous devez maintenant enregistrer la méthode dans le répertoire principal des méthodes, par défaut C:\Chem32\1\Methods, à l'aide du menu **File > Save As > Method** ou du menu **Method Menu > Save Method As**.

Glossaire d'IU

1

1260 Infinity Autosampler
: échantillonneur automatique 1260 Infinity

1260 Infinity Binary Pump
: Pompe binaire 1260 Infinity

1260 Infinity DAD
: DAD 1260 Infinity

1290 Infinity TCC
: TCC 1290 Infinity

A

Add
: Ajouter

Add Chromatogram Output
: Ajouter sortie de chromatogramme

Add to Method
: Ajouter à la méthode

Adjust
: Ajuster

Advanced
: Avancé

Advanced - Analog Output
: Avancé - Sortie analogique

Advanced - Autobalance
: Avancé - Stabilisation automatique

Advanced - Auxiliary
: Avancé - Paramètres supplémentaires

Advanced - High Throughput
: Avancé - Haut débit

Advanced - Lamps on required for acquisition
: Avancé : Lampes allumées requise pour l'acquisition

Advanced - Margin for Negative Absorbance
: Avancé - Marge pour absorbance négative

Advanced - Spectrum
: Avancé - Spectre

All
: Tous

All in Peak
: Tout dans le pic

All Programs
: Tous les programmes

Apex+Baselines
: Apex+Lignes de base

Apex+Slopes+Baselines
: Apex+Pentes+Lignes de base

Apply
: Appliquer

Apply to Method
: Appliquer à la méthode

Area Reject
: Réjection d'aire

Area Reject / Height Reject
: Réjection d'aire / Réjection de hauteur

As Detector Cell
: Identique à la cuve du détecteur

As Pump/Injector
: En tant que pompe/injecteur

Attenuation
: Atténuation

Automatic delay volume reduction
: Réduction du volume de retard automatique

Available Signals
: Signaux disponibles

B

Balance
: Stabilisation

Bandwidth
: Bande passante

Based on
: Basés sur

Baseline Correction
: Correction de la ligne de base

BinPump
: PompeBin

C

Calculate
: Calculs

Calculation mode
: Module de calcul

Calibration
: Étalonnage

Cancel
: Annuler

Change Contacts
: Contacts

Change Peak –detector Peakwidth
: Largeur de pic du détecteur

Change Signal
: Signal

Change Spectra Acquisition Mode
: Mode d'acquisition des spectres

Change Threshold
: Seuil

Change...
: Modifier...

Check Method Sections to Edit
Cocher les sections de méthode à modifier
Chromatogram Output
Sortie de chromatogramme
Clear all
Tout effacer
Column Switching Valve
Vanne d'inversion entre colonnes
Combined
Combinées
Comment
Remarque
Customized Data Analysis Macro
Macro d'analyse de données personnalisée
Cut
Couper

D

Data Acquisition
Acquisition de données
Data Analysis
Traitement des données
Delete Row
Supprimer Rangée
Draw position
Position d'aspiration
Draw speed
Vitesse d'aspiration

E

Edit Entire Method
Modifier l'ensemble de la méthode
Edit Integration Events
Modification des événements d'intégration
Edit Signal Plot
Modifier le tracé des signaux
Eject speed
Vitesse d'éjection
Enable overlapped injection
Permettre le chevauchement des injections
Enhanced Solvent Compressibility
Compressibilité du solvant améliorée
Equilibration time
Durée d'équilibrage
Every 2nd Spectrum
Un spectre sur deux

F

File
Fichier
File Setting
Paramètres de fichier
Flow
Débit
Flush Port
Voie de lavage

H

Height Reject
Réjection de hauteur
HiP-ALS Injector Program
Programme d'injection du HiP-ALS

I

Initial Events For All Signals
Événements initiaux pour tous les signaux
Injection Mode
Mode d'injection
Injection Valve Cleaning
Nettoyage de la vanne d'injection
Injection volume
Volume d'injection
Injection with needle wash
Injection avec lavage de l'aiguille
Injector Cleaning
Nettoyage de l'injecteur
Instrument Curves
Courbes de l'instrument
Integrate
Intégrer
Integration
Intégration
Integration Events
Événements d'intégration
Integration Events...
Événements d'intégration...
Integration OFF/ON
Intégration MARCHE/ARRÊT
Intensity Test
Test d'intensité

L

Launch online
Lancer en ligne
Load Method
Chargement de méthode
Location
Emplacement

M

Method
Méthode
Method and Run Control
Contrôle de méthode et d'analyse
Method History
Historique de la méthode
Method Information
Informations sur la méthode
Method Menu
Méthode

Method...
Méthode...
Methods
Méthodes

N

Name Pattern
Modèle de nom
Needle Wash
Lavage de l'aiguille
New Method...
Nouvelle méthode...
No Limit
Aucune limite
No Limit / Off
Aucune limite / Désactivé
None
Aucun

O

Off
Désactivé
Online Plot
Tracé en ligne
Online Signals
Signaux en ligne
OpenLAB Control Panel
Panneau de configuration OpenLAB

P

Parameter
Paramètre
Parameter Mismatch
Mésappariement de paramètres
Paste
Coller
PDF
PDF
Peak Width
Largeur de pic
Peakwidth
Largeur de pic
Post Time
Temps post-analyse
Postrun
Postanalyse
Post-Run Command / Macro
Commande ou macro de post-analyse
Posttime
Temps postanalyse
Prerun
Pré-analyse
Pre-Run Command / Macro
Commande ou macro de pré-analyse
Pressure Limits
Limites de pression
Printer
Imprimante
Pump
Pompe

Q

Quantitation settings
Paramètres de quantification
Quantitative results sorted by
Résultats quantitatifs triés par

R

Range
Plage
Reference Bandwidth
Bande passante de référence
Reference Wavelength
Longueur d'onde de référence
Remove
Supprimer
Repeat
Répétition
Report
Rapport
Report mode
Mode de création de rapport
Report Style
Style de rapport
Reporting settings
Paramètres des rapports
Response
Réponse
Run Control
Contrôle d'analyse
Run Method
Exécuter la méthode
Run Queue
File d'attente d'analyses
Run Sequence
Exécuter une séquence
Run Time Checklist
Liste de contrôle de l'exécution
Run Time Checklist...
Liste de contrôle de l'exécution...

S

Sample flush out factor
Facteur de rinçage de l'échantillon
Sample Info
Informations sur l'échantillon
Sample name
Nom de l'échantillon
Save
Enregistrer
Save As
Enregistrer sous
Save As...
Enregistrer sous...

Save Method As
Enregistrer la méthode sous

Save Method As...
Enregistrer la méthode sous...

Save Method with Data
Enregistrer la méthode avec les données

Screen
Moniteur

Select Run Method Task
Sélectionner la tâche d'exécution de méthode

Selected Signal
Signaux sélectionnés

Selected Signals
Signaux sélectionnés

Set Integration Events Table
Paramétrer le tableau d'événements d'intégration

Setup Instrument Method...
Configuration de la méthode de l'instrument...

Setup Method
Configuration de la méthode

Show timetable graph
Afficher le tracé du gradient

Signal Description
Description du signal

Signal Details
Détails des signaux

Signal Window 1
Fenêtre de signal 1

Signals
Signaux

Single Runs
Analyses uniques

Size
Taille

Skip
Ignorer

Slope Sensitivity
Sensibilité de pente

Solvents
Solvants

Specific Events For Signal
Événements spécifiques pour un signal

Specify Report
Définition du rapport

Spectrum Store
Enregistrement des spectres

Standard Data Analysis
Analyse de données standard

Standard injection
Injection standard

Start
Démarrer

Step
Pas

Stop Time
Temps d'arrêt

Stop Time / Post Time
Temps d'arrêt/Temps post-analyse

Stoptime
Temps d'analyse

Store
Enregistrer

Subdirectory
Sous-répertoire

Switch [module name] on
Allumer le [nom du module]

System On/Off
Système Marche/arrêt

T

Temperature
Température

Threshold
Seuil

Time
Durée

Timetable
Tableau des événements

U

Unique PDF file name
Nom fichier PDF unique

Unique Sequence Folder Creation
Séquence unique de création de dossier

Use Signal
Utiliser le signal

V

Vial/Location
Flacon/emplacement

Vial/Well bottom sensing
Détection du fond de flacon/puits

View
Vue

W

Wash Vial
Flacon de lavage

Water
Eau

Wavelength
Longueur d'onde

Wavelength Calibration
Étalonnage de la longueur d'onde

Z

Zero Offset
Décalage zéro

Index

A

accessoire de rinçage actif des joints 11
ADVR 50
Agilent
  sur Internet 112
alterner la régénération des colonnes 49
altitude de fonctionnement 23
altitude hors fonctionnement 23
amorçage
  avec une pompe 80
analyse
  données 98

C

calculateur
  coûts 34
capteur de pression 14
caractéristiques
  communications 25
  performance 24
  sortie de signal analogique 25
caractéristiques de
  performance 24
caractéristiques physiques 23
caractéristiques
  contrôle et évaluation des données 25
  physiques 23
changement des solvants 81
chargement
  par défaut 86
classe de sécurité I 104
colonne
  température 37
  thermostatisation 37
colonnes
  particules sub-2-microniques 34
Compartiment à colonne thermostaté
  description 17
compensation de la compressibilité 24
compensation, compressibilité 24
composants du système
  compartiment à colonne thermostaté 17
  détecteur à barrette de diodes 19
conception 11
configuration de la méthode de l'instrument 116
configuration du volume de retard faible 43
configuration du volume de retard moyen 44
configuration et installation du système
  intégration au réseau 72
configuration optimisée
  colonnes d.i. 2,1 mm 43
  colonnes d.i. 3 et 4 mm 45
configuration volume de retard standard 45
configuration
  tracé en ligne 87
  volume de retard faible 43
  volume de retard moyen 44
  volume de retard standard 45
contrôle et évaluation des données 25
cuve à circulation 65

D

DEF_LC.M 113
dégazeur à vide 26
détecteur à barrette de diodes
  description 19
détecteur
  parvenir à une meilleure sensibilité 64
deux pistons en série 11
dimensions 23
données
  analyse 98
durée de cycle
  configuration de l'instrument 49

É

échauffement par frottement 37

E

ensemble de contrôle 14

É

Équation de van Deemter 29
évaluation des données et contrôle 25

E

exactitude de la composition 25

F

facteur de rétention 32
formation du gradient 24
fréquence secteur 23

G

gamme de pH recommandée 24

gamme de pH 24
guide de démarrage rapide
introduction 84

H

humidité 23

I

Informations sur la méthode 114, 115
injections chevauchantes 50
installation
Lab Advisor 71
logiciel de commande 70
système de données 70
Instrument/Acquisition 114
intégration au réseau 72
intégration 100
Internet 112

L

le traitement des données, 114
Liste de contrôle de l'exécution 114

M

mélange sous haute pression 11
mélangeur 11
méthode
injection unique 96
mise en place 94
modifier l'ensemble de la méthode 113
par défaut 113

N

Normes de
sécurité 23

O

obstructions de colonne
empêcher 67
optimisation de la résolution
compartiment à colonnes 58
conditions chromatographiques 61
fréquence d'acquisition 60
volume extra-colonne 59
optimisation
parvenir à de plus hautes résolutions 55
parvenir à de plus hautes sensibilités 62
volumes d'injection 47
optimisation
conditions de HPLC 31
cuve à circulation 65
sensibilité du détecteur 64
séparation chromatographique 31
utilisation de la colonne 64

P

particules sub-2-microniques 34
plage de composition 25
plage de débit réglable 24
plage de débit 11
opérationnel 24
réglable 24
plage de fréquences 23
plage de tension 23
plateaux théoriques 32
poids 23
pompe à vide 14
pompe binaire 11
précision de débit 24
précision de la composition 25
précision du débit 24
Présentation du dégazeur 14
pression
plage de fonctionnement 24
pulsation 24
principe de fonctionnement 14
puissance consommée 23
purge 89

R

rapport
définition 101
réduction automatique du volume de retard 50
résolution
augmentation 55
optimisation 55

S

sécurité
informations générales 104
symboles 106
sensibilité
configuration de l'instrument 63
optimisation 62
solutions tampons 11
solvants, changement 81
sortie de signal analogique 25
système hydraulique 24
système
mise sous tension 85

T

tableau d'événements d'intégration 100
température ambiante de fonctionnement 23
température ambiante hors fonctionnement 23
température de fonctionnement 23
température hors fonctionnement 23
tension secteur 23
tracé en ligne

configuration 87
transfert 51, 53

V

vanne de sélection de solvant 11
volume d'injection
parvenir à des volumes plus élevés 47
volume de retard
commutation automatique 42
description 40
exemple 40
volume de retard 25, 40
volume extra-colonne
description 41
volume supplémentaire de la colonne 40

www.agilent.com

Contenu de ce manuel

Ce manuel contient des informations à propos du système CPL binaire Agilent Infinity 1260.

Il aborde les points suivants :

- description du produit,
- introduction,
- spécifications,
- optimisation du système,
- configuration et installation du système,
- guide de démarrage rapide.

© Agilent Technologies 2006, 2008-2011, 2013

Printed in Germany
02/2013

G1312-93303

Agilent Technologies